255401 (1)

C. VELICAN • D. VELICAN

organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv

DAB II-1055

IT 295

Scanned with OKEN Scanner

Organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv.

În lumina rezultatelor cercetărilor efectuate de autori și a unui extrem de bogat material bibliografic, se face o analiză a relațiilor dintre structură și funcțiile țesutului conjunctiv, pe baza cunoștințelor actuale privind organizarea sa macromoleculară. Sînt prezentate numeroase date privind particularitățile fizico-chimice și biochimice, sinteza, degradarea și modul de agregare, în substanță fundamentală, fibrile și fibre, a macromoleculelor de colagen, elastină, mucopolizaharide acide și glicoproteine. Apar larg analizate influențele exercitate asupra organizării macromoleculare a țesutului conjunctiv, de către procesul de îmbătrînire, de anumite boli cronice degenerative (ateroscleroza, hipertensiunea arterială, hepatitele cronice și cirozele hepatice, reumatismul, scleroemfizemul pulmonar), precum și de inflamații, reacții imunologice și proliferări neoplazice. Sînt aduse la cunoștința cititorului posibilitățile de care dispune astăzi medicina spre a influența această organizare macromoleculară prin intermediul hormonilor, vitaminelor, agenților antiinflamatori, iradiațiilor. Monografia include și ipoteze originale privind rolul alterărilor stabilității structurale a macromoleculelor în patogenia bolilor, deschizînd astfel noi perspective profilactice și curative.

Scanned with OKEN Scanner

C. VELICAN și DOINA VELICAN

ORGANIZAREA MACROMOLECULARĂ A ȚESUTULUI CONJUNCTIV

Scanned with OKEN Scanner

Studiul țesutului conjunctiv a fost multă vreme neglijat de cercetători, întrucît acestui țesut i se atribuia în organism numai rolul de susținere a celulelor diferitelor parenchimuri, minimalizîndu-se astfel importanța sa în patologie. Reducerea progresivă a numărului bolilor acute, predominanța actuală în patologia umană a unor boli cronice ca emfizemul pulmonar, ateroscleroza, ciroza hepatică, nefrita cronică sau reumatismul cronic, precum și rolul tot mai evident pe care îl au alterările țesutului conjunctiv în patogeneza acestor maladii, au reactualizat în cursul ultimelor două decenii interesul pentru studiul acestui țesut. El stă astăzi nu numai în centrul atenției clinicienilor și anatomopatologilor, ci și al imunologilor, biochimiștilor, biofizicienilor, radiobiologilor etc.

Autorii acestei monografii studiază de multă vreme, în laborator, pe material uman și experimental, acele modificări în organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv care însoțesc apariția și evoluția bolilor. Cercetările lor au început cu sclerozele pulmonare de etiologie tabagică, au continuat apoi cu studiul mastocitelor, al substanței fundamentale, al membranelor bazale și al fibrelor reticulinice, pentru a ajunge la o investigare mai adîncă a alterărilor tuturor componentelor macromoleculare ale țesutului conjunctiv în ateroscleroză, în hepatită cronică și ciroze, în otoscleroze, în artrita reumatoidă, precum și în anumite nefropatii. În cadrul acestor cercetări s-au imaginat și au fost puse la punct metode histochimice complexe, care le-au permis să coreleze histochimia cu biochimia și chimia macromoleculară, trecîndu-se de la aspectele descriptive, la analize ale organizării macromoleculelor.

În lumina experienței personale acumulată și a bogatului material informativ de care dispun, autorii și-au propus să prezinte în această monografie stadiul actual al cunoștințelor privind organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv, în organismul normal și patologic. Sînt menționate numeroase date privind constituția substanței fundamentale, a fibrelor reticulinice, colagene și elastice, a modificărilor pe care acestea le suferă în

Scanned with OKEN Scanner

cursul procesului de îmbătrînire și în variate procese patologice, precum și sub influența a numeroși factori terapeutici : hormoni, vitamine, agenți anti-inflamatori, agenți fizici.

Lucrarea cuprinde ipoteze originale privind rolul alterărilor în stabilitatea structurală a macromoleculelor, ca mecanism patogenic al bolilor. Aceste ipoteze sînt susținute de rezultatele cercetărilor proprii și de o informație bibliografică la zi.

Deși prin caracterul analitic al unor capitole și prin numărul mare al datelor de specialitate, lectura pare uneori mai dificilă, totuși bogăția perspectivelor patogenetice ce se deschid în domeniul studiului unor boli cronice deosebit de importante prin frecvența lor, perspectivele de aplicații terapeutice și legăturile ce se realizează între histologie, biochimie, biofizică și patologie, dau acestei monografii o valoare particulară. Ea atrage atenția asupra unor aspecte încă necunoscute ale patogenezei bolilor cronice degenerative și invită la noi cercetări în domeniul biologiei țesutului conjunctiv și al rolului pe care acest țesut îl are în patologie.

Academician prof. dr. doc. ION BRUCKNER
directorul Institutului de medicină internă
al Academiei de științe medicale.

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Pag.

Introducere 19

CAPITOLUL I. MACROMOLECULELE ȚESUTULUI CONJUNCTIV ȘI MODUL LOR DE ORGANIZARE STRUCTURALĂ

Considerații generale 23

Colagen 27

Structură 27

Compoziția în aminoacizi 27
Macromolecula (tropocolagenul) 30
Fibrila 38
Mecanismele de stabilizare structurală 44

Sinteză 51

Hidroxilarea prolinei 53
Hidroxilarea lizinei 56
Asamblarea ribozomilor 56
Aspecte celulare ale sintezei colagenului 58

Fibroblastul 58
Condroblastul 60
Osteoblastul și calcificarea colagenului 60

Degradare 64

Colagenazele 66

Colagenazele bacteriene 66
Colagenazele animale 68

Proteazele nespecifice 70

Tripsina 70
Pepsina 70
Catepsinele 71
Pronaza 72

Elastină 73

Structură 73

Analiza componentei proteice 74
Analiza componentei glucidice 76
Analiza componentei lipidice 76

Scanned with OKEN Scanner

	Pag.
Organizarea macromoleculară şi corelaţia structură-funcţie	77
Sinteză	80
Sinteza desmozinelor şi a lizino-norleucinei	80
Aspecte celulare ale sintezei elastinei	84
Degradare	84
Elastazele	84
Elastaza pancreatică	85
Elastaza bacteriană	91
Proteazele nespecifice	91
Corelaţia colagen-elastină	92
Mucopolizaharide	94
Structură	94
Acidul hialuronic	94
Condroitin-sulfaţii	95
Heparina	98
Heparitin-sulfatul	100
Keratosulfatul	100
Sinteză	102
Fosforilare	102
Transmutarea radicalului fosfat	102
Încorporare în complexe nucleotidice	102
Epimerizare	102
Transformare aldo-cetoză	103
Aminare: formarea hexozaminelor	103
Acetilare: formarea acetilhexozaminelor	103
Oxidare: formarea acizilor uronici	103
Reducere: sinteza fucozei	103
Donorii	103
Acceptorii	104
Enzimele de transfer	104
Activatorii	104
Încorporarea radicalilor sulfat	104
Aspecte celulare ale sintezei mucopolizaharidelor	106
Degradare	110
Hialuronidazele	110
Hialuronidaza testiculară	111
Hialuronidaza bacteriană	112
Condroitinaza	113
Heparinaza	113
Oligozaharidazele	116
Lizozimul	116
Beta-glucuronidaza	116
Depolimerizarea oxido-reductoare	117
Glicoproteine	118
Structură	118
Glicoproteina din reticulină şi membrane bazale	119

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

Glicoproteine de „structură" 121
Glicoproteine prezente în condiţii patologice 122
Glicoproteina alfa$_1$ acidă 122
Imunoglobulinele 122
Fibrinogenul 123

Sinteză 123

Fucoza 124
Acidul sialic 124
Aspecte celulare ale sintezei glicoproteinelor 126

Degradare 127

Sialidaza 128
Proteazele 129

CAPITOLUL al II-lea. MODIFICĂRILE ORGANIZĂRII MACROMOLECULARE A ŢESUTULUI CONJUNCTIV DETERMINATE DE ÎMBĂTRÎNIREA ORGANISMULUI

Introducere 131

Mecanismul de „îmbătrînire" a macromoleculelor de colagen . . . 133

Teoria excesului de conectări intermoleculare 133
Teoria retracţiei termodinamice spontane 138

Aspecte particulare ale „îmbătrînirii" ţesutului conjunctiv 144

Vase 145

Elastina 147
Colagenul 153
Mucopolizaharidele 155
Glicoproteinele 157
Consideraţii morfo-funcţionale 159

Cord 162
Plămîni 163
Cartilaj 167
Os 173
Piele 178

Colagenul şi elastina 178
Mucopolizaharidele şi glicoproteinele 182

CAPITOLUL al III-lea MODIFICĂRILE ORGANIZĂRII MACROMOLECULARE A ŢESUTULUI CONJUNCTIV DETERMINATE DE PROCESE PATOLOGICE

Procese patologice cu caracter general 186

Inflamaţia 186

Stadiul de hipostabilizare structurală 186
Substanţa fundamentală 186
Modificată 189
De „substituţie" 189

Pag.

Nefuncţională 190
Membrane bazale şi fibre reticulinice 191
Fibra de colagen 192
Stadiul de normostabilizare structurală 195
Granulomul şi cicatrizarea plăgilor 195
Stadiul de hiperstabilizare structurală 200
Scleroza postinflamatoare 200
„Colagenizarea" reticulinei 203

Alterări imunologice 205
Fibrinoidul 206
Hialinul 209
Amiloidul 211
Rolul macromoleculelor constitutive ale ţesutului conjunctiv, în apariţia proceselor imunologice. . . . 217

Proliferări neoplazice 222

Procese patologice cu caracter particular 226

Ateroscleroza 226
Probleme de histogeneză 226
„Susceptibilitatea" peretelui arterial 229
Rolul mucopolizaharidelor acide 235

Hipertensiunea arterială 241
Rolul membranelor bazale din glomerulii renali. . . 241

Hepatite cronice şi ciroze 248
Particularităţi biochimice şi morfologice ale procesului de fibroză hepatică 250
Problema reversibilităţii leziunilor de fibroză hepatică 256

Reumatism 260
Otoscleroza 266
Boli ereditare 268
Clasificare 268
Sindromul Hurler 269
Sindromul Marfan 271

CAPITOLUL al IV-lea. MODIFICĂRILE ORGANIZĂRII MACROMOLECULARE A ŢESUTULUI CONJUNCTIV DETERMINATE DE AGENŢI TERAPEUTICI

Hormoni 273
Epifizar 275
Somatotrop 276
Tireotrop 278
Corticotrop 279
Gonadotropi 280
Tiroxina 280
Hormonul paratiroidian 284
Insulina 287

Pag.

Glucocorticoizii 288
Mineralocorticoizii 293
Catecolaminele 294
Estrogenii 295
Progesteronul 298
Androgenii 299
Hormonii care determină ovulaţia 299
Hormonii care determină relaxarea simfizei pubiene 300
Hormonii care determină modificările uterului 301

Vitamine 303
Vitamina C 303
Vitamina A 307
Vitamina E 307

Agenţi antiinflamatori 308
Salicilaţii 308
Fenilbutazona 309
Antimalaricele de sinteză 310
Sărurile de aur 311

Agenţi Varia 311
Penicilamina 312
Actinomicina D 312
Citostalul 313
Histamina 313
Fierul 313
Heparina 314
Acidul hialuronic şi condroitin-sulfaţii 316

Iradiaţii 317
Colagenul şi elastina 318
Substanţa fundamentală 322

BIBLIOGRAFIE 325

Scanned with OKEN Scanner

CONTENTS

Preface 5
Contens 7
Introduction 13

CHAPTER I: MACROMOLECULES OF CONNECTIVE TISSUE AND THEIR STRUCTURAL ORGANIZATION

General considerations 23

Colagen 27

Structure 27

Amino acids 27
Macromolecules 30
Fibrils 38
Mechanisms of structural stabilization 44

Synthesis 51

Proline hydroxylation 53
Lysine hydroxylation 56
Occurrence of the polyribosomes 56
Intracellular synthesis of collagen 58
Fibroblast 58
Chondroblast 60
Osteoblast 60

Degradation 64

General aspects 64
Bacterial collagenases 66
Animal collagenases 68
Unspecific proteases 70
Trypsin 70
Pepsin 70
Cathepsins 71
Pronase 72

Elastin 73

Scanned with OKEN Scanner

Structure 73

Proteins 74
Carbohydrates 76
Lipids 76
Macromolecules and structure-function relationship 77

Synthesis 80

Desmosine and lysine-norleucine 80
Intracellular synthesis of elastin 84

Degradation 84

Pancreatic elastase 85

Elastoproteinase 87
Elastomucase 90
Elastolipoproteinase 90

Bacterial elastase 91
Unspecific proteases 91

Problem of collagen-elastin relationship 92

Mucopolysaccharides **94**

Structure 94

Hyaluronic acid 94
Chondroitin-sulfates 95
Heparin 98
Heparitin sulfate 100
Keratosulfate 100

Synthesis 102

Phosphorylation 102
Transmutation of the phosphate group 102
Incorporation in nucleotide complexes 102
Amination : formation of hexosamines 103
Acetylation : formation of acetylhexosamines . . . 103
Oxidation : formation of uronic acids 103
Donnors 103
Acceptors 104
Transfer enzymes 104
Activators 104
Incorporation of sulphate groups 104
Intracellular synthesis of mucopolysaccharides . . 106

Degradation 110

Hyaluronidases 110

Testicular 111
Bacterial 112

Chondroitinases 113
Heparinases 113
Oligosaccharidases 116

Scanned with OKEN Scanner

Lysozyme 116
Beta-glucuronidase 116
Oxido-reductive depolymerisation 117

Glycoproteins 118

Structure 118
Glycoproteins of reticular fibers and basement membranes 119
Other "structural" glycoproteins 121
Glycoproteins occurring in pathologic tissues 122
Acid alfa$_1$-glycoprotein 122
Immunoglobulins 122
Fibrinogen 123

Synthesis 123
Fucose 124
Sialic acid 124
Intracellular synthesis of glycoproteins 126

Degradation 127
Sialidases 128
Proteases 129

CHAPTER II: CHANGES IN THE MACROMOLECULAR ORGANIZATION OF CONNECTIVE TISSUE DUE TO AGING

Introduction 131

Mechanisms of collagen macromolecule aging 133
Intramolecular hypercross-linking theory 133
Thermodinamically spontaneous retraction theory 138

Particular aspects of connective tissue aging 144
Blood vessels 145
Elastin 147
Collagen 153
Mucopolysaccharides 155
Glycoproteins 157
Morpho-functional correlations 159
Heart 162
Lungs 163
Cartilage 167
Bone 173
Skin 178
Collagen and elastin 178
Mucopolysaccharides and glycoproteins 182

CHAPTER III: CHANGES IN THE MACROMOLECULAR ORGANIZATION OF CONNECTIVE TISSUE DUE TO PATHOLOGIC PROCESSES

General pathology 186

Inflammation 186

Scanned with OKEN Scanner

Structural hypostability stage 186
Ground substance 186
Modified 189
Substitutive 189
Non-functional 190
Basement membranes and reticular fibres . . . 191
Collagen fibres 192

Structural normostability stage 195
Granuloma and cicatrization 195

Structural hyperstability stage 200
Postinflammatory sclerosis 200
"Collagenization" of reticular fibres 203

Immune alterations 205

Fibrinoid 206
Hyalin 209
Amyloid 211
Antigenicity of connective tissue macromolecules 217

Neoplastic proliferations 222

Special pathology 226

Atherosclerosis 226
Histogenesis of lesions 226
Arterial wall "susceptibility" 229
Role of acid mucopolysaccharides 235

Arterial hypertension 241
Role of the basement membranes of renal glomeruli 241

Chronic hepatitis and cirrhosis 248
Biochemical and morphological peculiarities of hepatic fibrosis 250
Reversibility of hepatic fibrosis 256

Rheumatism 260
Otosclerosis 266
Hereditary diseases 268
Classification 268
Hurler's syndrome 269
Marfan's syndrome 271

CHAPTER IV: CHANGES IN THE MACROMOLECULAR ORGANIZATION OF CONNECTIVE TISSUE DUE TO THERAPEUTIC AGENTS

Effect of hormones 273
Epiphysis hormone 275
Growth hormone 276
Thyrotropic hormone 278

Scanned with OKEN Scanner

Adrenocorticotropic hormone 279
Gonadotropic hormone 280
Thyroxin 280
Effects of thyroidectomy 282
Parathormone 284
Insulin 287
Glucocorticoids 288
Mineralocorticoids 293
Catecholamines 294
Estrogens 295
Progesterone 298
Testosterone 299
Hormonal influences on ovarian follicle 299
Hormonal influences on pubian symphisis 300
Hormonal influences on uterus 301

Effect of vitamins 303
Vitamin C 303
Vitamin A 307
Vitamin E 307

Effect of antiinflammatory drugs 308
Salicylates 308
Phenylbutazone 309
Antimalarial drugs 310
Gold salts 311

Effect of other agents 311
Penicillamine 312
Actinomycin D 312
Citostal 313
Histamine 313
Iron 313
Heparin 314
Hyaluronic acid and chondroitin-sulfates 316

Effect of radiations 317
Collagen and elastin 318
Ground substance 322

BIBLIOGRAPHY 325

INTRODUCERE

Valorificarea rezultatelor cercetărilor efectuate în cursul ultimelor două decenii asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv s-a reflectat prin importante progrese în prevenirea şi tratarea a numeroase boli, în dirijarea vindecării plăgilor şi fracturilor, în îmbogăţirea cunoştinţelor de patogenie şi de fiziopatologie. Pe baza acelorași valorificări, s-au făcut paşi înainte în utilizarea colagenului pentru fire chirurgicale, ca agent hemostatic, în confecţionarea protezelor şi filmelor necesare prevenirii aderenţelor. Dar, problemele ridicate de studiile privind organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv au depăşit cu mult graniţele medicinei, interesînd specialişti din domeniul biologiei, biochimiei, chimiei fizicale şi macromoleculare, ca şi din anumite sectoare ale industriei farmaceutice, pielăriei, cleiurilor şi polimerilor sintetici.

Datorită importanţei considerabile pe care o are ţesutul conjunctiv în menţinerea homeostaziei tuturor paranchimurilor, precum şi datorită rolului primordial pe care îl joacă în dezvoltarea intra- şi extra-uterină, în procesele de îmbătrînire, în reacţiile la variaţi agenţi patogeni, în apariţia şi evoluţia bolilor cu cea mai extinsă morbiditate şi mortalitate, cunoaşterea progreselor realizate în studiul organizării macromoleculare a acestui ţesut, apare deosebit de utilă pentru medicii de toate specialităţile.

Prezenta monografie îşi propune să vină în întîmpinarea acestei necesităţi, însumînd principalele date de chimie fizicală şi macromoleculară, de biochimie şi histochimie, de patologie experimentală şi anatomie patologică, de fiziologie şi fiziopatologie, de farmacodinamie şi terapeutică, folositoare unei înţelegeri cît mai adînci şi mai complete a organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv.

Ţinem să precizăm că sub denumirea de *organizare macromoleculară* vom descrie şi analiza modul în care principalele substanţe constitutive ale ţesutului conjunctiv — colagenul, elastina, glicoproteinele şi mucopolizaharidele acide — sînt agregate în complexe macromoleculare, individualizate de microscopia clasică sub termenii convenţionali de : fibră de colagen, fibră elastică, fibră reticulinică, membrană bazală şi substanţă fundamentală.

Analiza noastră cuprinde datele cele mai noi privind :

— structura, sinteza şi degradarea macromoleculelor constitutive ale ţesutului conjunctiv, precum şi particularităţile modului lor de agregare în complexe macromoleculare ;

Scanned with OKEN Scanner

— influenţa exercitată de îmbătrînirea organismului asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv;

— modificările care apar în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv în cursul proceselor patologice în general, şi în bolile cu cea mai extinsă morbiditate şi mortalitate în special;

— posibilităţile de care dispunem astăzi de a influenţa organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv prin intermediul terapeuticii preventive şi curative.

Oferim astfel cititorului datele necesare cunoaşterii, în toată complexitatea lor, a interrelaţiilor dintre funcţia şi structura ţesutului conjunctiv, în condiţii normale şi patologice, analizate la nivel macroscopic, microscopic, electronomicroscopic şi macromolecular, insistînd în special asupra acestui ultim domeniu în care biochimia, biofizica şi morfologia îşi intrică sferele de investigaţie.

Centrată pe un subiect bine precizat, la rezolvarea căruia îşi aduc contribuţia discipline foarte variate, lucrarea noastră nu încearcă să se substitue capitolelor privind ţesutul conjunctiv din cursuri, monografii sau tratate, ci foloseşte doar anumite date proprii fiecărei specialităţi, în scopul unei prezentări cît mai complexe a acestui subiect. De aceea şi iconografia este selectivă, limitată la anumite exemplificări, în special din lucrările publicate de autori. Pe aceiaşi linie de prezentare, justificăm şi absenţa unor date elementare privind histologia şi anatomia patologică a ţesutului conjunctiv, precum şi etiopatogenia, clasificarea, diagnosticul, evoluţia sau tratamentul bolilor analizate.

Parcurgînd materialul expus, se va putea constata că etapa în care interesul pentru patologia ţesutului conjunctiv a fost în mod temporar limitat la un grup de afecţiuni, impropriu denumite „colagenoze", avînd în frunte reumatismul, lupusul şi sclerodermia, pare astăzi mult depăşită. Pe baza metodologiei moderne, studiul organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv este tot mai intens solicitat să aducă contribuţii de interes teoretic şi practic, în probleme privind etiopatogenia, histogeneza, evoluţia şi tratamentul aterosclerozei, hipertensiunei arteriale, scleroemfizemului pulmonar, cirozelor hepatice, osteoporozelor, osteoartrozelor, otosclerozei, cataractelor, precum şi ale altor boli cu largă răspîndire în masă; apar, pe baza aceloraşi studii asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv, căi noi de abordare profilactică a patologiei renale, pulmonare, endocrine şi a anumitor boli profesionale; în sfîrşit, se deschid orizonturi noi de profilaxie şi în problema patologiei senescenţei sau a celei asociate senescenţei. Materialul prezentat în această monografie, ca şi numeroasele lucrări ce nu au putut fi citate într-o exemplificare voit limitată, demonstrează că bolile care au astăzi cea mai extinsă morbiditate şi mortalitate sînt determinate, întreţinute sau agravate, de alterări în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv.

*

Cercetările efectuate de noi în cursul ultimilor ani [1124], [1125], [1131], ne-au permis să evidenţiem un mecanism nou în patogenia bolilor, bazat

Scanned with OKEN Scanner

pe *alterările stabilității structurale a macromoleculelor*. În acest sens am adus anumite contribuții privind rolul alterărilor stabilității structurale a macromoleculelor în patogenia aterosclerozei [1107, 1108, 1109, 1100], a cirozelor hepatice [1126], a otosclerozei [1126], a ulcerului gastric [1133], a artritei reumatoide [1130].

Prezenta monografie, ca și monografia recentă *Hisochimie des glucides en pathologie humaine* (Gauthier-Villars, Paris, 1969) [1131], reprezintă puncte de plecare, atît pentru susținerea bazelor teoretice ale concepției noastre, cît și pentru demonstrarea ei prin acumulare de material faptic. Tehnicile cu care am lucrat sînt amănunțit prezentate în monografia citată și nu au mai fost incluse în lucrarea de față.

*

Aducem prinos de recunoștință, celui care a îndreptat pașii noștri spre orientarea anatomo-clinică, regretatului academician N. Gh. Lupu. Exprimăm sentimentele noastre de adîncă prețuire acad. prof. I. Bruckner, care ne-a ajutat cu o afectuoasă, înțeleaptă și critică îndrumare, la realizarea unor cercetări incluse în această monografie.

Mulțumim colaboratoarelor: Georgina Georgescu, pentru contribuția la efectuarea desenelor, la munca de dactilografiere și de întocmire a bibliografiei; Florina Filip, Ernestina Popova, Marina Zisu, Stela Ionicioiu, Elena Alexandrescu și Sofia Velicu, pentru efortul depus pe linia metodologiei histochimice și histopatologice, precum și lui Victor Ganea, pentru calitatea microfotografiilor.

21 August 1969

Autorii

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL I

MACROMOLECULELE CONSTITUTIVE ALE ŢESUTULUI CONJUNCTIV ŞI MODUL LOR DE ORGANIZARE STRUCTURALĂ

CONSIDERAŢII GENERALE

Timp de un secol, elementele care alcătuiesc ţesutul conjunctiv au fost studiate la dimensiunile permise de limita de rezoluţie a microscopului optic. Pe baza acestor studii s-au conturat noţiunile clasice privind histologia şi anatomia patologică a acestui ţesut, în cadrul căruia s-au individualizat: fibra de colagen, elastică şi reticulinică, membrana bazală, substanţa fundamentală, matricea cartilaginoasă şi osoasă.

În cursul ultimelor două decenii, abordarea studiului ţesutului conjunctiv cu metodologia nouă de care dispune morfologia (microscopie electronică, histochimie, histoenzimologie, imunohistochimie, histoautoradiografie), ca şi investigarea paralelă a acestui ţesut cu tehnici de biochimie, chimie fizicală şi macromoleculară, difractomerie, radiobiologie etc. a permis să se coboare limita dimensiunilor structurilor analizate pînă la nivelul macromoleculelor şi al substanţelor ce intră în constituţia lor.

Rezultatele acestor cercetări au modificat în mare măsură concepţiile noastre privind funcţiile ţesutului conjunctiv, demonstrîndu-se că, pe lîngă un simplu rol mecanic, de rezistenţă la tracţiuni şi de susţinere a diferitelor parenchimuri în relaţii spaţiale adecvate, el participă intens la menţinerea homeostaziei, prin procese continue de sinteză, degradare şi remodelare.

În plus, au mai fost corelate cu funcţiile ţesutului conjunctiv : circulaţia lichidelor în ţesuturi, concentraţia extracelulară a electroliţilor, existenţa de bariere permeabile în mod selectiv (acţionînd ca răşini organice schimbătoare de cationi), capacitatea peretelui arterial de a funcţiona ca un polimer cu două faze, ca şi mecanismul difuziunii alveolare, al filtrării glomerulare, al lubrefierii suprafeţelor articulare, al apariţiei ovulaţiei etc. În sfîrşit, tot în lumina acestor rezultate s-a putut demonstra că modificările organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv preced uneori cu mult timp leziunile decelabile prin metodele histopatologice de rutină. Apare astfel perspectiva studierii, la nivel macromolecular, a stadiilor reversibile ale leziunilor, orientare pe care am considerat-o a face parte

Scanned with OKEN Scanner

din ceea ce am propus să se denumească : anatomie patologică „preclinică" [1098].

★

Cercetările efectuate de noi în cursul ultimilor ani, privind histogeneza leziunilor bolilor cronice degenerative cu largă răspîndire în masă, ne-au permis să evidenţiem că anumite macromolecule ale ţesutului conjunctiv sau ale mucinelor epiteliale, prezintă un patern deosebit de reactivitate faţă de cel normal atunci cînd sînt puse în contact cu soluţii care rup legături electrostatice sau punţi de hidrogen, ca şi atunci cînd sînt incubate cu enzime ce degradează selectiv anumite substanţe constitutive ale complexelor macromoleculare. Aspecte de reactivitate alterată, similare cu cele întîlnite *in vivo*, au putut fi reproduse *in vitro*, prin modificarea artificială a numărului legăturilor intra- şi intermoleculare, a numărului şi poziţiei sterice a grupărilor reactive, a cantităţii substanţelor ce alcătuiesc respectivele macromolecule.

Plecînd de la aceste observaţii disparate am încercat să evidenţiem un nou mecanism patogenic al bolilor, determinat de *alterările de stabilitate structurală a macromoleculelor* [1124, 1125, 1131]. Date amănunţite asupra acestui mecanism vor forma subiectul unei monografii viitoare. În rîndurile care urmează vom preciza doar anumite idei generale ce stau la baza acestei ipoteze, susţinută prin numeroase exemplificări, menţionate în cele patru capitole ale cărţii.

Păstrarea organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv, în condiţiile unei continuie interacţiuni a macromoleculelor cu mediul înconjurător şi în condiţiile unei continuie reînoiri sau/ şi remodelări a componentelor fiecărei macromolecule a fost considerată de noi ca expresia fizico-chimică a capacităţii de „autoprotecţie" a biopolimerilor [1124, 1131], reflectată pentru fiecare macromoleculă în parte printr-un anumit grad de *normostabilitate*.

Am propus, pe primul plan, trei grupe de factori fizico-chimici care asigură biopolimerilor gradul de normostabilitate, adecvat capacităţilor funcţionale şi rolului biologic.

I. *Legăturile intramoleculare, intermoleculare şi dintre agregatele de macromolecule.* Aceste legături determină o neutralizare a forţelor care tind să menţină izolate componentele constitutive ale macromoleculelor. Astfel, deşi posedă acelaşi tip de sarcini electrice negative ce se resping reciproc, mucopolizaharidele acide, acidul sialic şi acizii aspartic şi glutamic din proteine sînt interconectaţi prin variate legături în cuprinsul aceleiaşi macromolecule sau complex macromolecular, fiecare funcţie acidă avînd o poziţie sterică bine definită.

II. *Substanţele ce alcătuiesc biopolimerul, natura lor, raportul lor calitativ şi configuraţia lor sterică în arhitectura macromoleculei.* Datele ce vor fi prezentate în acest capitol vor demonstra, de exemplu, importanţa hidroxiprolinei pentru stabilitatea structurală a colagenului, importanţa desmozinei şi a izodesmozinei pentru interconectarea macromoleculelor de elastină, importanţa prezenţei acidului sialic la periferia macromoleculei de glicoproteine etc.

III. *Grupele ionizabile, grupele reactive, radicalii hidrofobi, tipul, numărul şi localizarea lor.* Cu cît aceste grupe sînt mai numeroase, există posibilitatea formării unui număr mai mare de legături, atît între acelaşi tip de macromolecule, cît şi între macromoleculele ţesutului con-

Scanned with OKEN Scanner

junctiv şi substanţe venite prin circulaţia interstiţială. Pe de altă parte, raportul dintre grupele hidrofile şi hidrofobe va regla gradul hidrofiliei tisulare, iar localizarea la suprafaţa macromoleculei a anumitor grupări polare, va crea zone de protecţie sterică, de mare importanţă pentru păstrarea normostabilităţii macromoleculei respective.

Existenţa unei normostabilităţi particulare pentru fiecare macromoleculă şi complex macromolecular este reflectată prin :

— Echilibrul relativ între etapele anabolică şi catabolică ale metabolismului, atît al moleculelor constitutive, cît şi al macromoleculelor şi al agregatelor macromoleculare. Ruperea acestui echilibru, cu predominanţa procesului de sinteză faţă de cel de degradare, va duce la acumulări interstiţiale sau/şi intracelulare, cu aspect de tezaurizare; dimpotrivă, predominanţa proceselor de degradare faţă de cele de sinteză, va determina „fuga" colagenului din rezervoarele naturale, rezultînd manifestări de tipul osteoporozei, sau liza fibrelor elastice, apărînd leziuni de tipul emfizemului.

— Integrarea fracţiilor variate ale constituenţilor complexelor macromoleculare ale ţesutului conjunctiv, în sisteme ierarhizate, rezultînd anumite prevalenţe funcţionale de tipul : extensibilităţii, elasticităţii, capacităţii de a acţiona ca o răşină organică schimbătoare de cationi, precum şi efecte antilipemice, anticoagulante, antitrombotice, antiinflamatoare etc.

— Anihilarea sau transformarea acţiunilor competitive în acţiuni cooperante, permiţînd complexului macromolecular să acţioneze şi să reacţioneze ca un întreg. Astfel, fibrele de colagen, deşi conţin amestecuri în proporţii variabile de colagen, proteine necolagene, glicoproteine şi mucopolizaharide acide, funcţionează ca o singură unitate.

— Dezvoltarea unor bariere structurale sau sterice, care să limiteze accesibilitatea anumitor factori competitivi sau destructivi. Vom exemplifica această afirmaţie cu rezultatele unor lucrări personale în care demonstrăm că acidul sialic împiedică colagenaza să degradeze fibrele de colagen din anumite matrici osoase [1107, 1129].

— Crearea unei rigidităţi macromoleculare, adaptate rezistenţei la *stress*-uri mecanice; asupra acestui subiect vom prezenta numeroase date din capitolul referitor la organizarea macromoleculară a fibrelor de colagen.

În literatura de specialitate, noţiunea de *stabilitate structurală*, folosită pînă acum numai de chimişti [209, 214] a fost utilizată ca punct de plecare în explicarea mecanismului apariţiei senescenţei, ca rezultat al unei hiperconectări intermoleculare.

Lucrările noastre au evidenţiat importanţa alterărilor stabilităţii structurale a macromoleculelor ca mecanism patogenic al bolilor, în special ca urmare a convertirii normostabilităţii în hipostabilitate structurală, reflectată prin diminuarea capacităţii biopolimerilor de a rezista la mecanismele fiziologice de degradare. Această hipostabilizare structurală apare prin scăderea numărului de legături intermoleculare,ca şi prin dispariţia anumitor grupări reactive sau substanţe cu importantă poziţie sterică

la periferia macromoleculei. În acest sens am adus anumite dovezi privind rolul hipostabilizării structurale a biopolimerilor în favorizarea apariţiei leziunilor din ateroscleroză [1103], hepatite cronice şi ciroze hepatice [1126], otoscleroză [1129], ulcer gastric[1133], artrita reumatoidă [1130], precum şi în inflamaţii în general [1131]. Un aspect particular al acestei hipostabilizări structurale a fost corelat, în cercetările noastre, cu eliminarea acidului sialic din complexele macromoleculare [1132].

Modul cum vor fi prezentate, în cuprinsul acestui capitol, datele privind structura, sinteza şi degradarea macromoleculelor constitutive ale ţesutului conjunctiv, precum şi datele privind particularităţile agregării lor în complexele macromoleculare ce apar sub aspectul fibrelor, membranelor bazale şi substanţei fundamentale, va fi în parte axat pe această concepţie, privind *rolul alterărilor stabilităţii structurale a macromoleculelor în apariţia şi întreţinerea bolilor.*

Scanned with OKEN Scanner

Colagen

Macromolecula de colagen reprezintă principalul subiect de studiu al ţesutului conjunctiv, datorită nu numai particularităţilor sale biologice, ci şi utilizării largi în variate domenii ale industriei. Colagenul constituie aproximativ 5% din greutatea organismului şi 30 — 35% din cantitatea totală a proteinelor, caracterizîndu-se printr-un patern particular al: *a*) compoziţiei în aminoacizi; *b*) secvenţei aminoacizilor în lanţul polipeptidic; *c*) aspectului difracţiei la raze X; *d*) periodicităţii la microscopul electronic; *e*) reactivităţii histochimice.

STRUCTURĂ

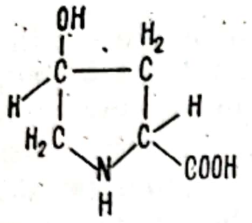
Compoziţia în aminoacizi

Analiza cantitativă a aminoacizilor constitutivi sugerează un patern similar al macromoleculei de colagen, indiferent de sursă (vezi tabelul I). Din punct de vedere cantitativ, cel mai important aminoacid apare glicina, reprezentînd aproximativ 30% din totalul rezidiilor. O proporţie de aproximativ 22% este alcătuită din prolină şi hidroxiprolină, ultimul constituind principalul test de identificare biochimică a prezenţei colagenului în ţesuturi. Hidroxiprolina alcătuieşte 9 — 10% din totalul rezidiilor de aminoacizi şi proporţia ei relativ constantă permite, plecîndu-se de la cantitatea sa, să se calculeze cantitatea totală a colagenului. Menţionăm că, în afara elastinei, unde se găseşte în proporţie de numai 1%, nici o altă proteină din organismul animal nu conţine hidroxiprolină. De aceea se poate afirma că prezenţa hidroxiprolinei „marchează" prezenţa colagenului. Forma predominantă sub care apare acest iminoacid este 4 — hidroxiprolina; s-a mai evidenţiat şi 3 — hidroxiprolina sau beta-hidroxiprolina [524, 810], reprezentînd aproximativ 4% din totalul hidroxiprolinei (*fig.* 1).

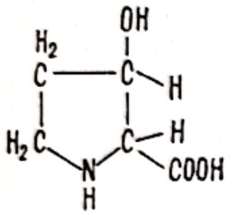
Prezenţa inelului pirolidinic al aminoacizilor constituie unul dintre factorii fundamentali care asigură stabilitatea structurală a lanţului polipeptidic al macromoleculei de colagen, creînd un grad ridicat de rigiditate. Aceste inele influenţează stereochimic dispoziţia spiralată a lanţului, determinînd o importantă limitare rotaţională, Aşa se explică de ce un lanţ polipeptidic bogat în prolină şi hidroxiprolină rămîne în soluţie cu dispoziţia iniţială spiralată, chiar dacă nu mai conţine punţi de hidrogen între molecule; dispoziţia spiralată se păstrează pînă la temperaturi ce ating 90°C [459]. De altfel, numeroase lucrări au demonstrat că există o core-

Scanned with OKEN Scanner

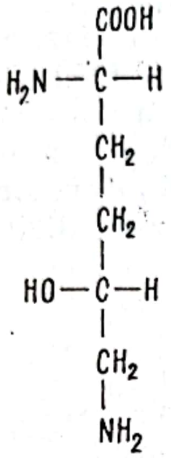
laţie între conţinutul în hidroxiprolină al fibrei de colagen şi rezistenţa sa la variate modalităţi de denaturare [429]. Strînsa dependenţă a stabilităţii structurale a colagenului de conţinutul în iminoacizi apare şi din studiul transformării gelatinei în fibrile. Prima modificare configuraţională la trecerea de la aspectul amorf, spre cel organizat, al macromoleculei de



4. Hidroxi-L-Prolină



3. Hidroxi-Prolină



5-Hidroxi-L-Lizină

Fig. 1. Structura 4-hidroxiprolinei, 3-hidroxiprolinei şi hidroxilizinei, aminoacizi caracteristici colagenului.

Tabelul I

Constituţia în aminoacizi a colagenului mamiferelor (rezidii %).

AMINOACIZI:	OS[747]	PIELE[148]
Glicina	31,9	33,0
Prolina	12,3	12,8
3-hidroxiprolina	nedeterminată	0,1
4-hidroxiprolina	10,0	9,3
Alanina	11,3	11,0
Acidul glutamic	7,2	7,3
Arginina	4,7	5,1
Acidul aspartic	4,7	4,5
Serina	3,6	3,6
Lizina	2,8	2,7
Leucina	2,5	2,4
Valina	2,4	2,4
Treonina	1,8	1,7
Izoleucina	1,3	1,0
Fenilalanina	1,4	1,2
Metionina	0,5	0,6
Hidroxilizina	0,35	0,58
Histidina	0,58	0,48
Tirozina	0,45	0,28
Cistina	0	0
Triptofan	absent sau urme	absent sau urme

Scanned with OKEN Scanner

colagen a fost evidenţiată în zona lanţului polipeptidic, bogată în prolină şi hidroxiprolină [481].

Hidroxilizina (*fig.* 1), deşi constituie numai aproximativ 1% din rezidiile de aminoacizi, reprezintă un component important în organizarea lanţului polipeptidic al macromoleculei de colagen, fiind implicată mai ales în crearea de legături cu fracţii glucidice.

Raportînd datele cantitative la numărul total de aminoacizi evidenţiaţi în colagen, rezultă că glicina constituie 3 din 9 rezidii, iminoacizii 2 din 9, alanina 1 din 9, aminoacizii polari (acizii aspartic şi glutamic, lizina, arginina) 2 din 9, iar restul de 1 din 9 ar cuprinde variate tipuri de aminoacizii neutri [891]. De menţionat cantitatea extrem de mică sau chiar absenţa totală a aminoacizilor sulfuraţi, de tipul cistinei şi cisteinei, ca şi a celor aromatici. În ceea ce priveşte variaţia cantitativă a anumitor aminoacizi în funcţie de sursa colagenului analizat, date mai importante se referă numai la hidroxilizină. Astfel, se menţionează o proporţie de 0,8% în colagenul din piele şi de 2,8% în colagenul din dentină [852]. În membrana bazală a glomerulilor renali a fost izolată o fracţie a colagenului ce conţine de 6 ori mai multă hidroxilizină în comparaţie cu colagenul din tendon, raportul hidroxilizină /hidroxiprolină fiind de 0,42 faţă de 0,07 [565].

Secvenţa aminoacizilor din lanţurile polipeptidice ale macromoleculei de colagen a fost analizată prin variate metode de degradare enzimatică şi chimică. Ca rezultat al hidrolizei acide sau alcaline, au apărut peptide cu greutate moleculară mică, alcătuite din 2 — 4 rezidii de aminoacizi. Investigarea lor a dus la concluzia că în lanţul polipeptidic al colagenului, glicina ocupă fiecare a 3-a poziţie, iar secvenţa predominantă este glicină-prolină-hidroxiprolină. Această secvenţă nu pare a fi însă constantă, existînd lanţuri polipeptidice în care glicina nu apare în mod obligator la fiecare 3 aminoacizi; există, de asemenea, secvenţe în care glicina este urmată tot de glicină, după cum au apărut succesiuni de 4 — 5 rezidii ce nu conţin glicină [415]. În sfîrşit, mai menţionăm izolarea de fracţii peptidice în care glicina era ataşată de aminoacizi bazici.

Investigaţiile efectuate prin degradare enzimatică sugerează că structura primară a colagenului este alcătuită din lanţuri polipeptidice în care alternează regiuni „cristaline", alcătuite din aminoacizi apolari, cu regiuni „amorfe", bogate în aminoacizi polari. Zonele apolare, cu un conţinut ridicat în prolină şi hidroxiprolină, prezintă repetarea ordonată a secvenţei glicină-prolină-hidroxiprolină, al treilea rezidiu putînd fi, de asemenea, alanina, glicina, glutamina, arginina, asparagina, fenilalanina, treonina şi serina [419, 805]. Tripeptidele acestea, de tip gli-pro-R constituie aproximativ 1/3 din totalul aminoacizilor şi se întîlnesc cel mai des cu secvenţele: gli-pro-hipro; gli-pro-gli; gli-pro-ala. Ele includ 94% din totalul prolinei şi 74% din totalul glicinei existente în colagen. Datele privind secvenţa aminoacizilor în regiunile polare sînt mai puţin bogate, sugerîndu-se că ar exista predominanţe ale aminoacizilor dicarboxilici în anumite peptide şi ale aminoacizilor bazici, în altele [416, 599]. Fragmente peptidice mai mari, alcătuind aşa-numita fracţie „nedializabilă" după digestie cu colagenază, au permis să se constate prezenţa iminoacizilor şi în regiunile considerate „amorfe"

Scanned with OKEN Scanner

ale macromoleculei, proporţia fiind de 7 moli % prolină, şi 5 — 6 moli% hidroxiprolină [800, 801]. S-a constatat că aproximativ 40 % din aminoacizii bazici sînt legaţi prin grupările lor carboxilice de iminoacizi. Acest tip de conectare rezistă digestiei cu tripsină, în timp ce legăturile aminoacizilor bazici cu glicina sînt hidrolizate de acelaşi ferment. În zonele polare ale macromoleculei de colagen s-a evidenţiat un tip special de punte peptidică, gamma-glutamil, apărînd în proporţie de 20 — 30 la 1000 de reziidii [348]; ea ar permite o mai mare flexibilitate, la acest nivel, a lanţului polipeptidic, diminuînd rigiditatea conferită de aglomerarea iminoacizilor în zonele cristaline apolare [985].

Arginina a fost evidenţiată atît în poziţia R din secvenţa gli-pro-R[802], cît şi în zona de tranziţie dintre regiunile polare şi cele apolare, unde este inclusă în secvenţa de tipul gli-pro-hipro-arg [805].

Datele acumulate pînă acum sugerează următorul model de distribuţie a aminoacizilor din lanţurile polipeptidice ale macromoleculei de colagen : — $(gli\text{-}pro\text{-}R)_n$-regiune polară — $(gli\text{-}pro\text{-}R)_n$ — regiune polară — $(gli\text{-}pro\text{-}R)_n$ etc.

Valoarea lui n, indicînd numărul secvenţelor repetabile dintr-o regiune apolară, este în medie de 5 — 7 (deci, aproximativ 21 de aminoacizi pe regiune apolară), dar poate varia în diferitele zone ale catenei polipeptidice [985]. Alternanţa regiunilor polare şi apolare se repetă în medie de 4 ori, pînă se ajunge la gruparea carboxil terminală a lanţului polipeptidic. Această structură discontinuă explică şi aspectul electronomicroscopic, cu succesiunea benzilor întunecate (ce corespund regiunilor polare, amorfe) şi a interbenzilor clare (ce corespund regiunilor apolare, cristaline).

Macromolecula (tropocolagenul)

Observaţii la microscopul optic au sugerat de multă vreme, existenţa unei ierarhizări structurale a fibrelor de colagen. Utilizarea metodelor de analiză chimică şi fizico-chimică, a microscopiei fotonice şi electronice, ca şi studii difractometrice şi radiobiologice au confirmat această ipoteză, identificînd în scara de organizare a structurilor colagene :

— *fibrele*, vizualizate cu microscopul optic, avînd diametre variabile de la ţesut de ţesut, valorile extreme ale acestor diametre fiind de 2 — — 40 μ şi 100 — 200 μ;

— *fibrilele*, evidenţiabile numai la microscopul electronic, cu diametrul variabil în funcţie de sursa tisulară; cele mai subţiri au grosimea de 200 — 300 Å, iar cele mai groase 500 — 700 Å;

— *filamentele*, evidenţiabile de asemenea numai la microscopul electronic, apar ca structuri imprecis individualizate, datorită absenţei periodicităţii caracteristice, diametrul lor variind între 50 — 60 Å;

— *protofibrilele*, identificate prin metode fizico-chimice, cu diametrul de aproixmativ 15 Å şi lungimi variabile;

Scanned with OKEN Scanner

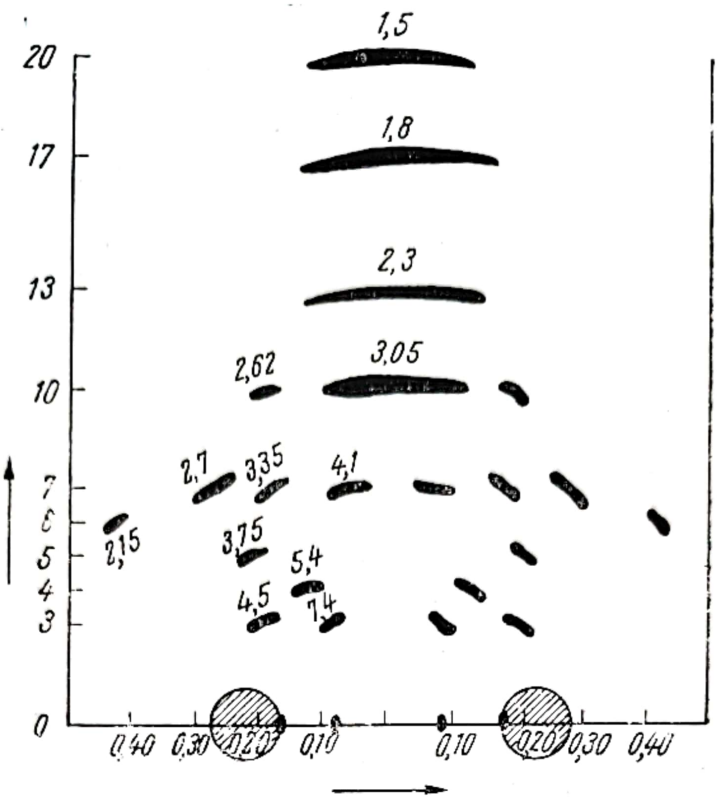


Fig. 2. Reprezentarea schematică a difractogramei colagenului, la raze X cu unghi mare (Ramachandran și Ambady [892]).

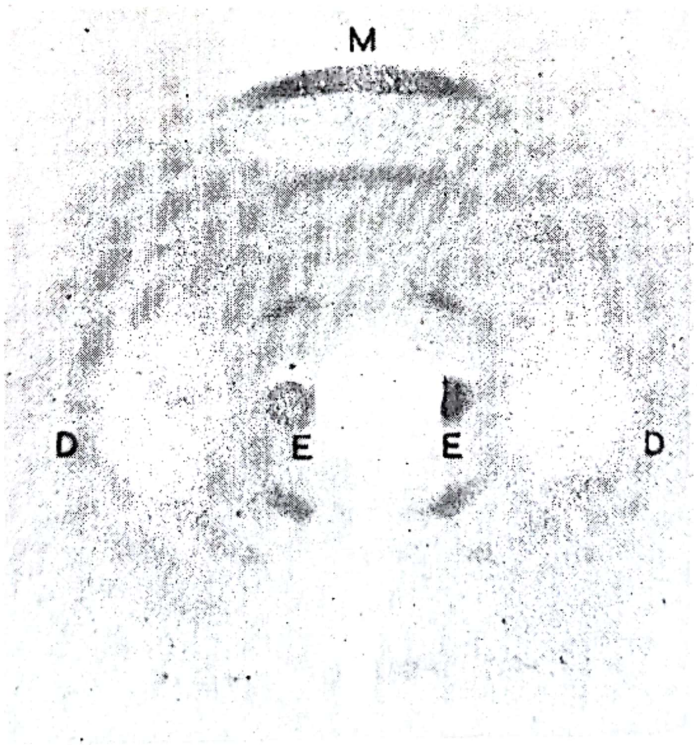


Fig. 3. Aspectul colagenului la difracție cu raze X cu unghi mare, utilizînd un fascicol de raze înclinat. M = arcul meridional de 3,05 Å; E = reflectarea ecuatorială la 10,4 — 15 Å; D = spoturile difuze la 4,4 Å (RAMACHANDRAN [891], reprodus cu permisiunea editurii Academic Press).

Scanned with OKEN Scanner

— *macromolecula* (tropocolagenul), avînd un diametru de aproximativ 15 Å şi lungimea de 2 800 — 3 000 Å, reprezintă unitatea fundamentală în constituţia tuturor structurilor colagenice.

Cea mai mare parte din informaţiile privind organizarea, la nivel macromolecular, a colagenului au fost obţinute prin difracţia la raze X cu unghi mare.

Această modalitate de investigaţie se bazează pe organizarea pseudocristalină a macromoleculei de colagen. Lanţurile polipeptidice care sînt agregate în direcţie relativ paralelă cu axul fibrei, realizează o reţea (grilă) longitudinală, ce determină difracţia razelor X în direcţia ecuatorială, faţă de axul fibrei; distanţa dintre două lanţuri polipeptidice, poate fi dedusă din poziţia spoturilor (reflectărilor) ecuatoriale. În acelaşi timp, în nucleul central al lanţurilor polipeptidice, se repetă secvenţa (NH — CHR — CO). Astfel, straturi de grupări atomice identice, alternează la intervale identice de-a lungul axului fibrei, formînd o reţea (grilă) transversală faţă de acest ax. Grila transversală produce difracţia razelor X în direcţie meridională.

Difractograma colagenului la raze *X* cu unghi mare (fig. *2* şi *3*) prezintă arcuri meridionale la 10 Å — 7,6 Å — 4,5 Å — 3 Å. Se remarcă îndeosebi arcul meridional, situat la aproximativ 3 Å (indicat prin litera M în figura 3), considerat a corespunde unităţii repetabile de-a lungul axei fibrei, respectiv distanţei ocupate de un rezidiu aminoacid. Determinarea mai precisă a acestei distanţe pe difractogramele obţinute cu fascicol înclinat de raze X dă valori de 2,95 Å pentru fibra neîntinsă şi 3,05 Å pentru cea întinsă [894]. Un alt element caracteristic pentru difractograma colagenului este spotul intens ecuatorial (indicat prin litera E în figura 3) situat la 10 — 15 Å (în funcţie de gradul de hidratare a fibrei) şi care este atribuit distanţei laterale dintre lanţurile polipeptidice adiacente. În sfîrşit, o altă particularitate o constituie spoturile difuze de la 4,4 Å (indicate prin litera D în figura 3); ele reprezintă distanţa medie dintre planurile grupărilor amido (—CO—NH—) ce se găsesc la un anumit nivel al macromoleculei în lanţurile polipeptidice din constituţia triplului helix.

Pe baza informaţiilor obţinute prin difracţia la raze X au fost construite o serie de modele ipotetice pentru configuraţia stereochimică a macromoleculei de colagen. Aceasta apare ca alcătuită din trei lanţuri polipeptidice (*fig. 4*) ale căror axe individuale nu sînt strict paralele cu axul fibrei, ci fiecare constituie o spirală răsucită spre stînga, denumită *helix minor*; cele trei lanţuri sînt apoi rotate împreună spre dreapta, în jurul unui ax comun, realizîndu-se *triplul helix* sau *helix major*, caracteristic colagenului [893], [897]. *Helix minor*, respectiv lanţul polipeptidic individual, conţine 10 rezidii de aminoacizi la fiecare 3 spire (3,28 rezidii per spiră), înălţimea reprezentată de proiecţia unui aminoacid pe axul helixului fiind de aproximativ 3 Å (2,95 — 3,05 Å, în funcţie de gradul de întindere a fibrei). Stabilizarea acestei structuri complexe se realizează prin legături de hidrogen intramoleculare de tipul NH...O = C, între grupările imino şi carbonil de pe lanţuri vecine. Numărul acestor legături variază în diferitele modele propuse. Modelul *Rich* şi *Crick* include o singură legătură

Scanned with OKEN Scanner

de hidrogen pentru fiecare 3 rezidii de aminoacizi. Cele două variante posibile ale acestui model diferă prin modul de aranjare a grupărilor hidroxil ale hidroxiprolinei: în „colagen I" grupările hidroxil sînt orientate spre axul triplului helix, participînd la conectarea intramoleculară a celor trei lanţuri polipeptidice; în „colagen II", grupul hidroxil al hidroxiprolinei este orientat radial, în afara axului triplului helix şi participă la conectarea intermoleculară cu helixuri triple adiacente. Modelul *Ramachandran* şi *Kartha* include, în structura „standard", două legături de hidrogen pentru fiecare 3 rezidii de aminoacizi (*fig.* 5). Totuşi, această structură standard poate exista numai în zonele macromoleculei unde, în secvenţa caracteristică a colagenului gli-R_2 — R_3, prolina şi hidroxiprolina nu apar împreună în poziţiile R_2 şi R_3. În regiunile unde apare secvenţa gli-pro-hipro, atomul de azot al inelului pirolidinic nu are atomi de hidrogen disponibili pentru constituirea de punţi. De aceea în prezenţa acestor secvenţe, configuraţia colagenului apare sub una, din cele două forme, denumite structuri „alternative" [894]. Prima dintre ele, caracteristică pentru existenţa secvenţei gli-pro-hipro într-un singur lanţ polipeptidic din cele 3 prezente în macromoleculă, are 5 legături de hidrogen (în loc de 6 posibile, în structura standard), pentru fiecare 9 rezidii de aminoacizi; a doua structură „alternativă", apărînd în prezenţa secvenţei gli-pro-hipro în toate cele 3 lanţuri polipeptidice, are numai 3 legături de hidrogen (din 6 posibile, în structura standard) pentru 9 rezidii de aminoacizi. Cercetări ulterioare au adus argumente atît pentru modelul *Rich* şi *Crick*, cît şi pentru modelul *Ramachandran*. Ultimul însă pare să fie mai adecvat pentru explicarea anumitor particularităţi fizico-chimice ale macromoleculei de colagen.

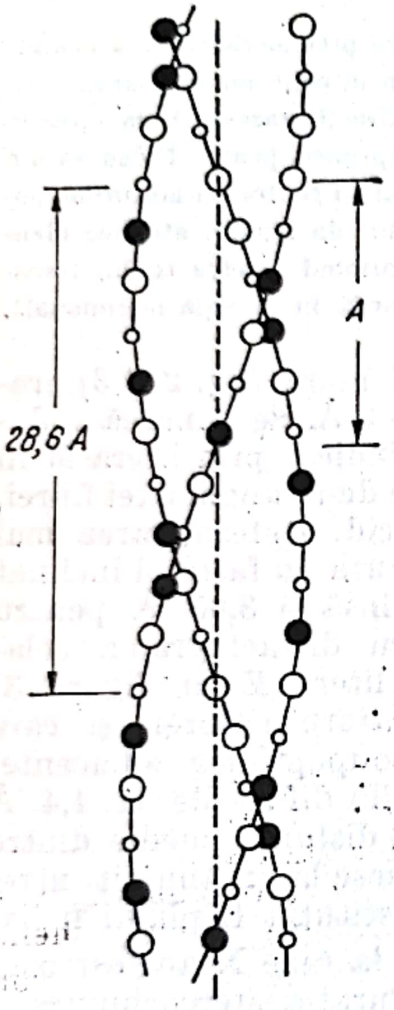


Fig. 4. Schema structurii triplului helix al macromoleculei de colagen: ● = hidroxiprolină; ○ = prolină; o = glicină.

Dacă investigaţiile prin difracţia la raze X cu unghi mare au relevat structura stereochimică a macromoleculei, studiile fizico-chimice asupra colagenului în soluţie au evidenţiat detalii importante privind modul de organizare a macromoleculei. Aceasta apare ca o particulă cu lungimea de aproximativ 3 000 Å, diametrul de 15 Å şi greutatea moleculară de aproximativ 300 000 [138]. Microscopia electronică a permis vizualizarea macromoleculelor sub forma unor bastonaşe cu dimensiuni ce confirmă pe cele

Scanned with OKEN Scanner

indicate de metodele fizico-chimice [447]; aspectul macromoleculelor de colagen este prezentat în *fig. 6*.

Macromoleculele sînt alcătuite din trei lanţuri polipeptidice denumite alfa, conţinînd fiecare în medie 1 000 — 1 200 de aminoacizi şi avînd gre-

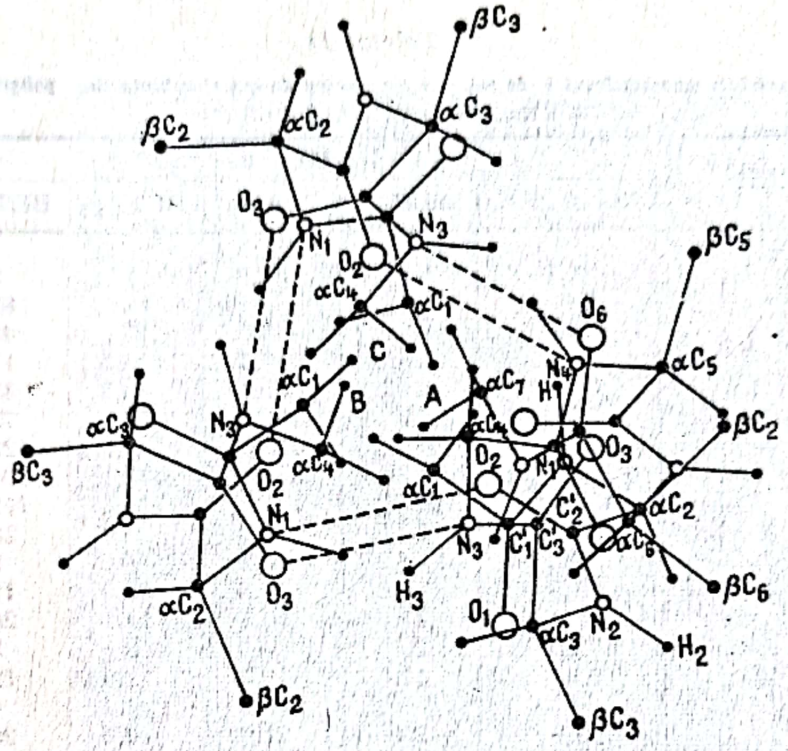


Fig. 5. Diagrama proiecţiei axiale a structurii „standard" a colagenului, modelul RAMACHANDRAN şi KARTHA. Se remarcă prezenţa a două legături de hidrogen, marcate prin linii întrerupte, la fiecare 3 rezidii de aminoacizi (RAMACHANDRAN [891], reprodus cu permisiunea editurii Academic Press).

utatea moleculară de 95 000 — 100 000. Cromatografia, pe coloană de carboximetilceluloză, a colagenului solubilizat în soluţii saline la pH neutru (fracţia neutrosolubilă a colagenului) a relevat existenţa a două tipuri de lanţuri alfa, desemnate ca alfa$_1$ şi alfa$_2$ [853], avînd o constituţie diferită în aminoacizi, menţionată în tabelul II. În componentul alfa$_1$ s-a constatat, în comparaţie cu lanţul alfa$_2$, prezenţa unor cantităţi mai importante de hidroxiprolină, prolină, alanină, fenilalanină şi lizină, în timp ce acidul aspartic, valina, leucina, izoleucina, hidroxilizina şi histidina apar în cantităţi mai reduse [551]. Raportul stoichiometric între componentele alfa$_1$ şi alfa$_2$ este de 2/1, sugerînd că în macromolecula de colagen există două lanţuri alfa$_1$ şi un lanţ alfa$_2$. A mai fost semnalată neomogenitatea fracţiunii alfa$_1$, în care se găsesc două componente polipeptidice, alfa$_1$ şi alfa$_3$, cu greutate moleculară de aproximativ 90 000, diferenţiate atît prin comportamentul cromatografic cît şi prin compoziţia în amino-

acizi. În lanţul alfa$_3$ s-a evidenţiat prezenţa triptofanului în proporţie de 1 rezidiu la 1 000 de rezidii de aminoacizi [849].

Lanţurile polipeptidice ce alcătuiesc macromolecula de colagen sînt solidarizate prin legături transversale, al căror număr creşte progresiv,

Tabelul II

Compoziţia în aminoacizi a macromoleculei de colagen din pielea de om şi a lanţurilor polipeptidice constitutive (BORNSTEIN şi PIEZ [148]; PIEZ [849])

AMINOACIZI	Rezidii $^0/_{00}$					
	COLAGEN	ALFA$_1$	ALFA$_2$	BETA$_{1.1}$	BETA$_{1.2}$	BETA$_{2.2}$
3-hidroxiprolină	1,1	0,8	0,9	1	1	1
4-hidroxiprolină	93	91	82	91	82	83
Acid aspartic	45	43	47	43	46	48
Treonină	17,4	16,5	19,2	16,3	17,9	19,3
Serină	35,6	36,8	35,1	36,7	35,2	34,1
Acid glutamic	73	77	68	76	72	68
Prolină	128	135	120	136	123	118
Glicină	330	333	337	332	338	339
Alanină	110	115	105	116	112	104
Valină	24,4	20,5	33,3	20,6	28,8	31,1
Metionină	6,2	4,9	5,2	5	5	5,4
Izoleucină	9,5	6,6	14,8	6,5	11,6	13,7
Leucină	24,3	19,5	30,1	19,1	26,1	30,7
Tirozină	2,8	2,1	4,6	2	3,8	4,6
Fenilalanină	12	12,3	11,7	12,5	12,3	12,2
Hidroxilizină	5,8	4,4	7,6	4,4	6,1	8
Lizină	26,9	30	21,6	30,1	25,2	21,3
Histidină	4,8	3	9,7	2	6,3	10,7
Arginină	51	50	51	51	49	50

pe măsura maturării proteinei. Existenţa acestui proces de conectare interlanţuri (*fig. 7*) a fost demonstrată prin identificarea în soluţiile de colagen, atît a fracţiilor alfa, cît şi a unor fracţii beta şi gamma cu greutate moleculară reprezentînd multipli ai greutăţilor moleculare caracteristice lanţurilor alfa. Astfel, tratarea soluţiilor de colagen cu agenţi cunoscuţi prin faptul că rup legăturile de hidrogen (căldură, KI, KBr, KCNS, uree) este urmată de o reducere marcată a rotaţiei optice şi a viscozităţii intrinsece[461]. Ultracentrifugarea acestor preparate ca şi a colagenului acidosolubil, obţinut prin tratare cu tampon citrat la pH 1,5 — 3,5 a evidenţiat, pe lîngă fracţia alfa, lentă (s_{20}, w 4, 0 S), cu greutate moleculară 100 000, şi o fracţie beta, mai rapidă (s_{20}, w 5,75 S), cu greutate moleculară 200 000 [814]. S-a constatat că există mai multe tipuri de fracţii beta care reprezintă dimeri, alcătuiţi din variate combinaţii a două lanţuri alfa. Au fost astfel identificate: dimerul beta$_1$ (sinonim beta$_{1.2}$), conţinînd un lanţ alfa$_1$ şi un lanţ alfa$_2$; dimerul beta$_2$ (sinonim beta$_{1.1}$), conţinînd două lanţuri alfa$_1$; dimerul beta$_{2.2}$, conţinînd două lanţuri alfa$_2$ [854]. Fracţiile gamma sînt trimeri, incluzînd 3 lanţuri polipeptidice alfa, unite prin legături transversale [17, 418].

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 6. Aspectul electronomicroscopic al macromoleculelor de colagen (× 1000 000), (HIGHBERGER[479]).

Scanned with OKEN Scanner

Lanţurile polipeptidice individuale ale macromoleculei de colagen reprezintă, la rîndul lor, agregate de subunităţi mai mici, ce pot fi separate prin acţiunea unor agenţi nucleofilici (hidroxilamina, hidrazina), cunoscuţi a cliva legăturile covalente de tip ester. S-a sugerat că fiecare lanţ polipeptidic alfa este alcătuit din 4 astfel de subunităţi, avînd greutate

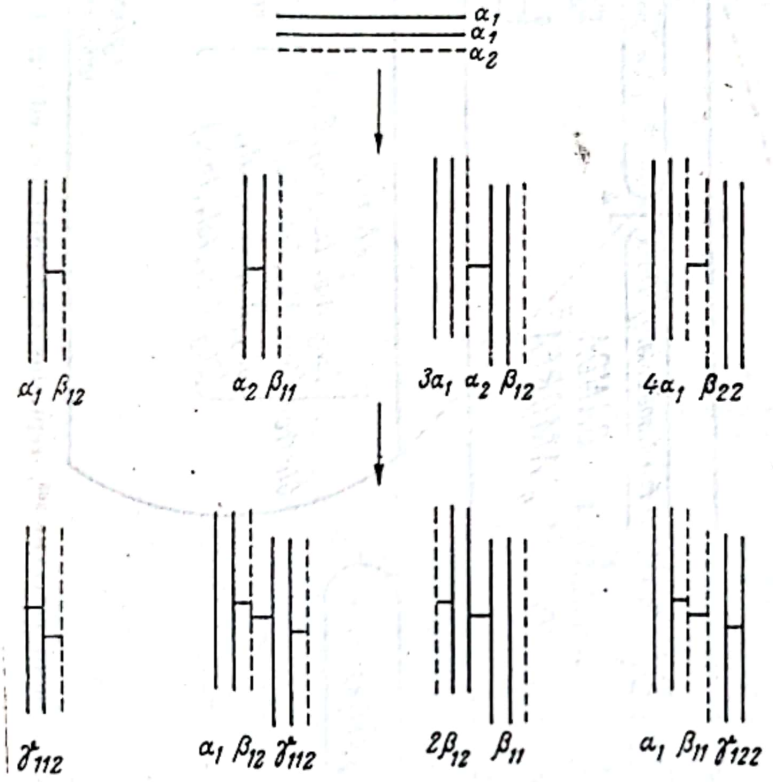


Fig. 7. Reprezentarea diagramatică a stadiilor diferite de formare a legăturilor transversale între lanţurile polipeptidice ale macromoleculei de colagen (PIEZ. BORNSTEIN, LEWIS şi MARTIN [855], reprodus cu permisiunea editurii BUTTERWORTHS)

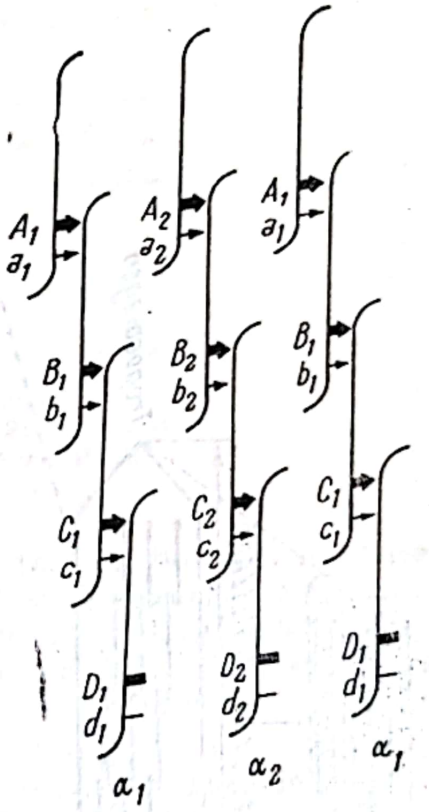


Fig. 8. Schema organizării lanţurilor polipeptidice alfa$_1$ şi alfa$_2$ din subunităţi conectate prin perechi de legături ester. A_1, A_2, B_1, B_2, C_1, C_2, D_1, D_2 sînt legături implicînd gruparea beta-carboxil a acidului aspartic preterminal; a_1, a_2, b_1, b_2, c_1, c_2, d_1, d_2, sînt legături implicînd gruparea alfa-carboxil a acidului aspartic terminal (GALLOP[366], reprodus cu permisiunea editurii L. A. Churchill).

moleculară 25 000 — 30 000[135] şi care sînt unite între ele prin 3 perechi de legături ester (*fig. 8*). La constituirea acestor legături participă, ca donori de grupe carboxil, rezidiile aspartil; pentru fiecare pereche de legături, intervine funcţia alfa-carboxil a rezidiului aspartil terminal şi funcţia beta-carboxil a rezidiului aspartil preterminal din fragmentul polipeptidic respectiv [366]. Natura grupului alcool, care participă la legătura ester, nu a fost încă precizată. Unele investigaţii tind să demonstreze că este vorba de gruparea hidroxil a unei hexoze, care serveşte, astfel, ca punte între

Scanned with OKEN Scanner

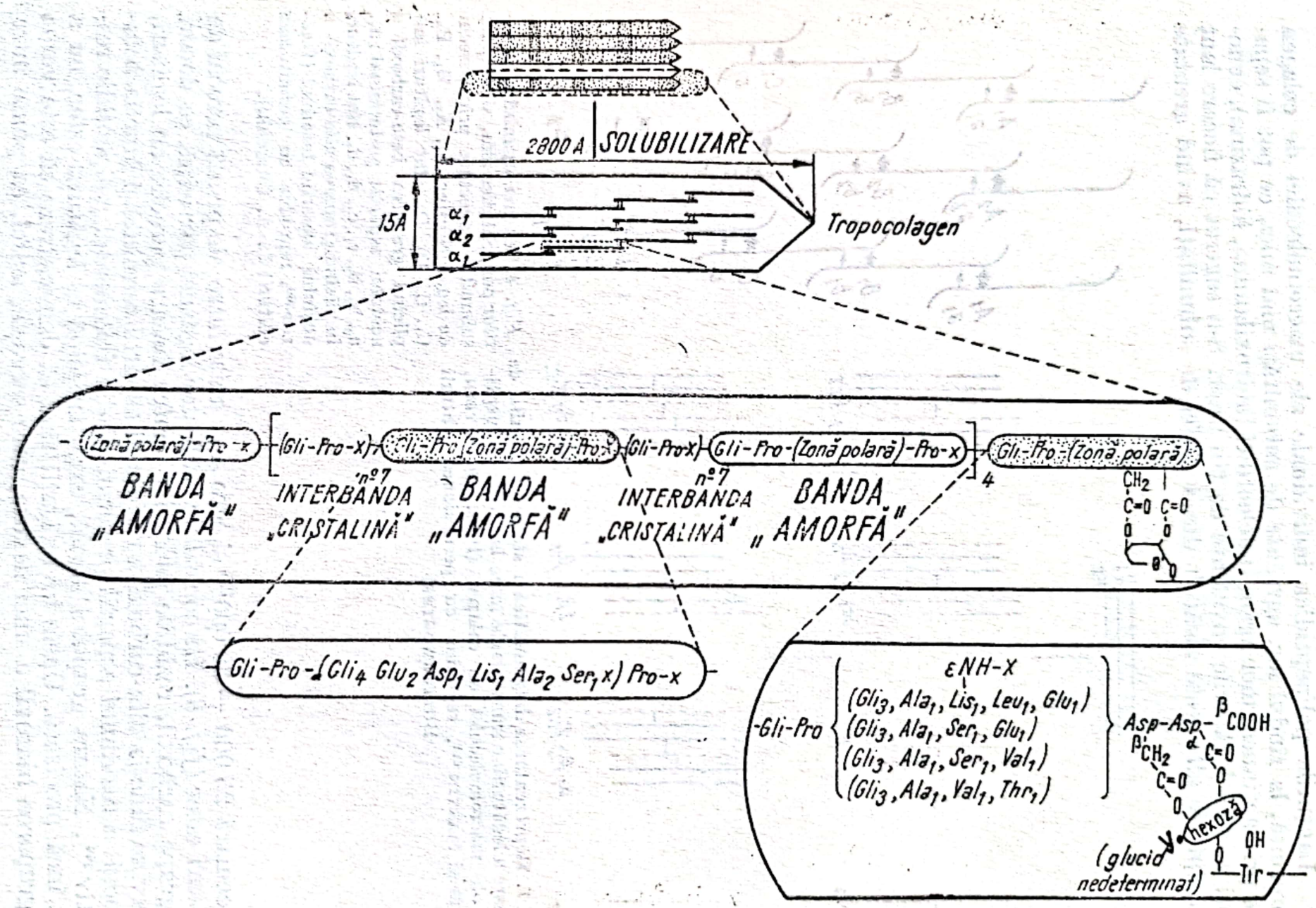


Fig. 9. Schema organizării macromoleculare a colagenului (GALLOP [366], reprodus cu permisiunea editurii L. A. Churchill).

Scanned with OKEN Scanner

lanţurile polipeptidice [492]. Chiar cele mai pure preparate de tropocolagen conţin hexoze în cantităţi mici, dar totuşi semnificative; a fost evidenţiată atît prezenţa glucozei, cît şi a galactozei, izolate, sau asociate într-un dizaharid [414, 430, 1024]. Totuşi, hexozele nu sînt repartizate uniform în raport cu variatele tipuri de lanţuri alfa, constatîndu-se o cantitate dublă de galactoză şi glucoză pentru lanţul $alfa_2$, în comparaţie cu lanţul $alfa_1$. De asemenea, cercetările care au utilizat oxidarea cu periodat şi hidroliza enzimatică cu

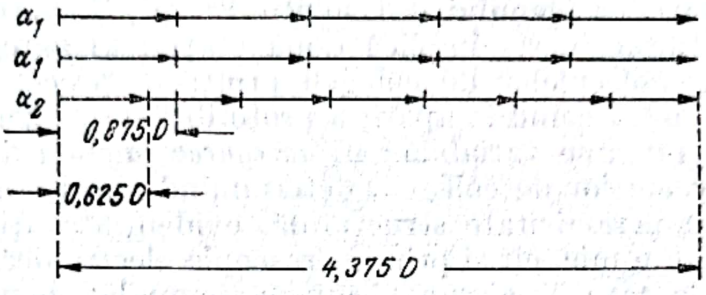


Fig. 10. Reprezentare schematică a modelului 5 : 7 al macromoleculei de colagen (Hodge, Petruska şi Bailey [485], reprodus cu permisiunea editurii Butterworth).

galactozo-oxidază susţin că nici glucoza, nici galactoza, nu pot fi evidenţiate direct la nivelul legăturilor ester [136]. Se sugerează că ar fi vorba de un component glucidic încă neidentificat, cu caracter bifuncţional, avînd structură de aldopiranoză la o extremitate, şi structură de 2-dezoxipiranoză, la cealaltă extremitate. Diagrama structurii macromoleculei de colagen este prezentată în *fig. 9*.

Constatarea polidispersiei greutăţilor moleculare în fracţiile ce conţin subunităţile lanţurilor polipeptidice, ca şi analiza electronomicroscopică a agregatelor laterale de macromolecule de colagen, a argumentat ipoteza participării a două tipuri de subunităţi în organizarea lanţurilor polipeptidice $alfa_1$ şi $alfa_2$. În modelul propus pentru acest mod de structurare (*fig. 10*), fiecare din cele două lanţuri $alfa_1$ este format din 5 subunităţi polipeptidice identice $delta_1$, cu greutate moleculară 20 000 şi conţinînd aproximativ 210 rezidii de aminoacizi. Lanţul $alfa_2$ rezultă din unirea a 7 subunităţi polipeptidice identice, desemnate ca $delta_2$, cu greutate moleculară 14 000 şi incluzînd aproximativ 150 de rezidii [485]. Determinarea dimensiunilor acestor subunităţi se bazează pe măsurarea distanţei D care reprezintă separaţia benzilor delta-delta succesive, observate în macromolecula de colagen la microscopul electronic, prin tehnicile de contrast negativ. Această separaţie este egală cu periodicitatea fibrelor de colagen, respectiv aproximativ 690 Å pentru fibra în stare umedă. S-au evidenţiat astfel următoarele relaţii:

Lungimea macromoleculei (L) = 4,40 D ± 0,02 D
Lungimea subunităţii $delta_1$ (l_1) = 0,875 D
Lungimea subunităţii $delta_2$ (l_2) = 0,625 D

Scanned with OKEN Scanner

Fibrila

Modul de constituire şi de creştere a fibrilelor rămîne una dintre cele mai importante probleme biologice legate de colagen, avînd implicaţii în procesele de formare a ţesutului conjunctiv, atît în condiţii normale, cît şi patologice.

Contribuţia fundamentală la înţelegerea mecanismelor care asigură agregarea macromoleculelor de colagen în fibrile a fost adusă de studiile asupra precipitării colagenului din soluţii [416], [599], [964]. Aceste investigaţii au sugerat că fibrilogeneza implică două etape: a) agregarea unidirecţională a macromoleculelor de colagen printr-un proces cu caracter de *polimerizare liniară*, ducînd la apariţia protofibrilelor, structuri cu diametrul de 15 Å şi lungime variabilă; b) *agregarea laterală* a protofibrilelor sau a macromoleculelor de colagen, determinînd apariţia fibrilelor, caracterizate printr-o periodicitate structurală, evidenţiată atît prin difracţia la raze X cu unghiu mic, cît şi prin microscopia electronică.

Difracţia la raze X cu unghi mic a semnalat, pentru prima dată, existenţa unei discontinuităţi de structură de-a lungul axului mare al fibrelor de colagen [93]. Elementul caracteristic al acestor difractograme este constituit de prezenţa reflectărilor (arcuri) meridionale, cu periodicitate de 640 Å — 700 Å (*fig. 11*). Microscopia electronică confirmă această periodicitate drept una din principalele particularităţi ale fibrelor native de colagen. Imaginile electronomicroscopice, realizate prin umbrire cu săruri de crom (*fig 12 a*), sau prin colorare cu acid fosfotungstic (*fig. 12 b*), relevă striaţia transversală a acestor fibre, cu alternanţă de benzi clare şi întunecate [962], [1193]. Iniţial, au fost semnalate 5 — 6 astfel de striaţii, într-o perioadă de 640 Å [963]; ulterior, pe măsura perfecţionării tehnicilor de evidenţiere, numărul striaţiilor identificate într-o perioadă a crescut pînă la 13 [789]. La precipitarea colagenului din soluţie s-a constatat că, în funcţie de condiţiile de mediu (pH, concentraţie ionică, adiţia unor agenţi nespecifici), pot să apară atît fibrile de tip nativ, cît şi structuri cu alt tip de agregare macromoleculară, toate fiind interconvertibile. S-au descris astfel (*fig. 13*): *a) fibrile de tip nativ*, în care macromolelculele de colagen sînt orientate paralel, agregate atît lateral, cît şi cap la cap, dar decalate cu 1/4 din lungimea lor faţă de macromoleculele din protofibrilele adiacente; *b) fibrile cu striaţii de 210 Å*, în care macromoleculele sînt orientate paralel, agregate atît lateral, cît şi cap la cap, cu decalare de 1/12 din lungimea lor; *c) fibrile nestriate*, în care macromoleculele de colagen sînt orientate paralel, agregate atît lateral, cît şi cap la cap, dar cu decalare neregulată; *d) fibrile de tip „fibrous long spacing"* (FLS), cu periodicitatea de 2 800 Å, în care macromoleculele de colagen sînt orientate antiparalel şi agregate atît lateral, cît şi cap la cap, formîndu-se prin adiţia alfa-glicoproteinei acide în soluţia de colagen; *e) segmente „long spacing"* (SLS), cu lungime de 2 800 Å, în care macromoleculele de colagen sînt orientate paralel şi agregate numai lateral, formîndu-se prin adiţia, în soluţia de colagen, a adenozintrifosfatului (ATP).

Scanned with OKEN Scanner

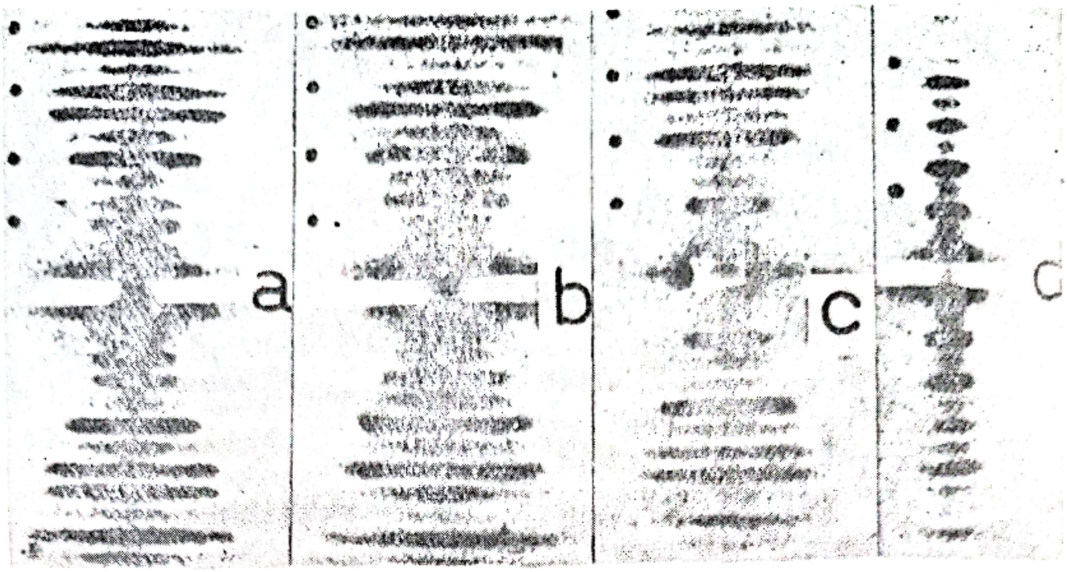


Fig. 11. Aspectul difractogramei la raze X cu urghi mic pentru: *a*) fibră de colagen uscată; *b*) fibră de colagen uscată, colorată cu acid fosfotungstic; *c*) fibră de colagen uscată, tanată cu crom; *d*) fibră de colagen umedă (RAMACHANDRAN [891], reprodus cu permisiunea editurii Academic Press).

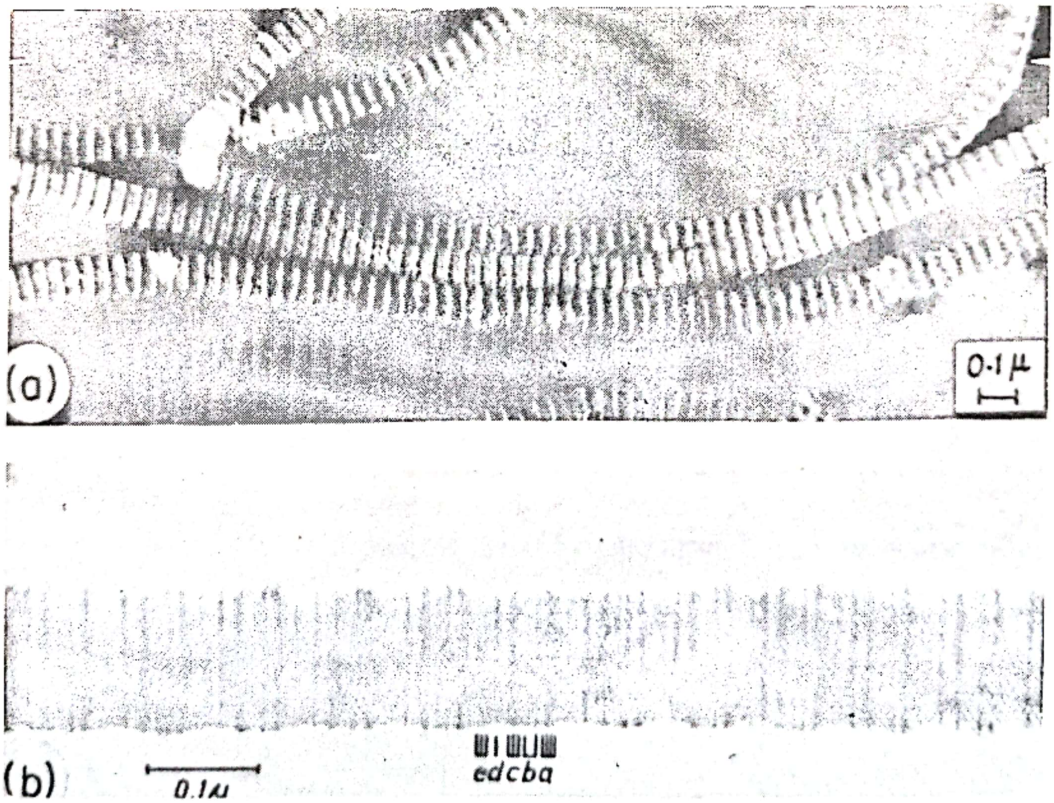


Fig. 12. Aspectul electronomicroscopic al fibrilei de colagen. *a*) Umbrire cu crom (HIGHBERGER [479]); *b*) Colorație cu acid fosfotungstic (KÜHN, HOFMANN și CRASSMANN[596])

Atît în colagenul de tip nativ, cît şi în celelalte forme ale colagenului reprecipitat din soluţie, striaţiile evidenţiabile electronomicroscopic nu sînt distribuite simetric. Aceasta sugerează că unităţile fundamentale constitutive comune sînt ele însile asimetrice, sau/şi sînt aranjate în mod asimetric. O argumentare judicioasă în sprijinul asimetriei macromolecule

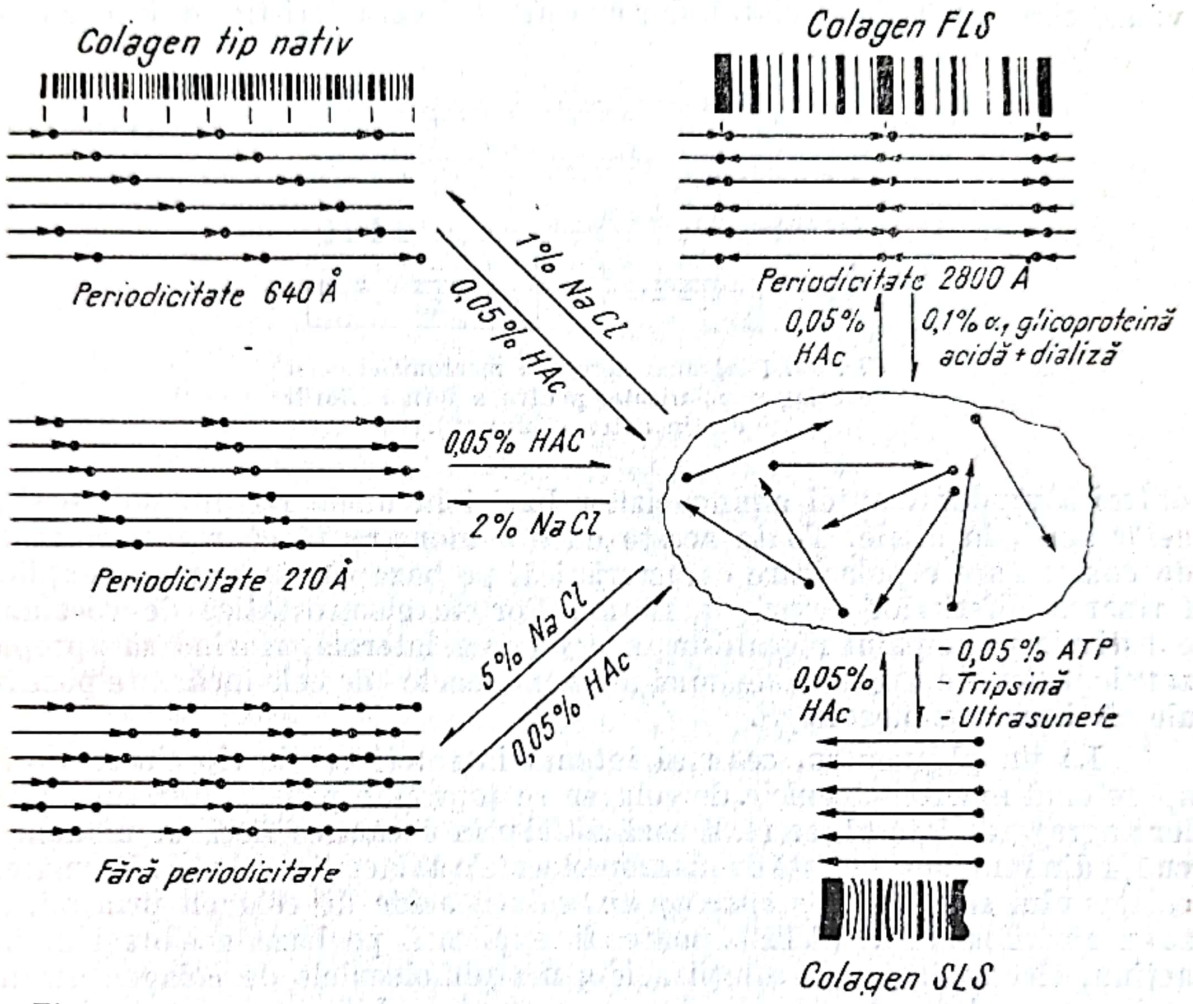


Fig. 13. Diagrama reprecipitării colagenului din soluţii în variate forme de agregare fibrilară (Schmitt [960], modificată).

de colagen o constituie aspectul electronomicroscopic al segmentelor *long spacing*, considerate a reprezenta amprenta moleculară (*molecular finger print*) a colagenului. Studii comparative ale imaginilor electronomicroscopice, obţinute atît prin colorare cu anionii de acid fosfotungstic, cît şi cu cationii de uranil, demonstrează că striaţiile sînt determinate de distribuţia neuniformă a aminoacizilor polari de-a lungul macromoleculei, benzile electron-dense corespunzînd regiunilor amorfe, polare, iar interbenzile clare, necolorabile, corespunzînd regiunilor apolare. Diferenţele de intensitate a striaţiilor evidenţiate, pe de o parte cu acidul fosfotungstic şi, pe de altă parte cu acetatul de uranil, reflectă diferenţele în concentraţia

relativă a grupărilor acide şi bazice, din diversele regiuni polare. Se ştie că acidul fosfotungstic pune în evidenţă fibrele de colagen, datorită afinităţii sale pentru rezidiile de lizină şi arginină, încărcate pozitiv [597], iar acetatul de uranil, datorită fixării pe rezidiile acide [598]. La colorarea segmentelor *long spacing* cu fiecare din aceşti reactivi, se constată prezenţa striaţiilor, în aceleaşi poziţii, de-a lungul macromoleculei (deci ambii permit vizualizarea regiunilor polare), dar cu diferenţe caracteristice de intensitate,

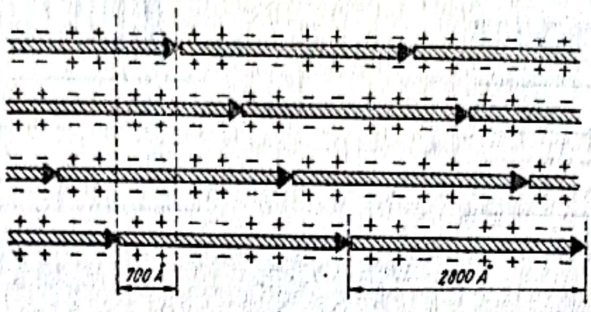


Fig. 14. Diagrama agregării macromoleculelor de colagen polarizate, pentru a forma fibrile de tip nativ (KUHN [595]).

datorită predominanţei aminoacizilor bazici în unele regiuni polare şi a celor acizi, în altele. Toate aceste date demonstrează că macromolecula de colagen are o polarizare caracteristică, pe baza căreia se poate explica formarea diferitelor tipuri de fibrile. Forţele electrostatice de coeziune constituie principalul mecanism în agregarea laterală, tinzînd să apropie zonele încărcate negativ ale unei macromolecule de cele încărcate pozitiv ale altei macromolecule [599].

La un pH neutru, cea mai intensă interacţiune de tip electrostatic apare cînd macromoleculele de colagen se suprapun prin 3/4 din suprafaţa lor; agregarea laterală se realizează astfel prin decalarea fiecărui monomer cu 1/4 din lungimea sa, faţă de macromoleculele adiacente (*fig. 14*). Formarea colagenului *segment long spacing* din soluţii acide de colagen prin adiţia adenozintrifosfatului (ATP), poate fi explicată pe baza aceloraşi interacţiuni electrostatice. În soluţii acide, macromoleculele de colagen au disociate numai funcţiile lor bazice, care sînt în echilibru cu ionii acizi din solvent. Prin adăugarea de ATP se produce înlocuirea competitivă a ionilor acizi de solvent, cu ionul ATP, mai puternic, şi se creiază condiţiile precipitării colagenului. În acelaşi timp însă, sarcinile pozitive ale macromoleculei de colagen nu sînt suficiente pentru ionii de ATP, care rămîn astfel apţi să lege altă macromoleculă de colagen. Distribuţia ordonată a sarcinilor electrice pe macromolecule şi capacitatea ionului ATP de a lega sarcini pozitive de intensitate egală, situate pe cele două molecule adiacente de colagen, fac ca agregarea laterală a acestora să se realizeze printr-o dispoziţie paralelă, cu extremităţile similar polarizate situate la acelaşi nivel. Legătura ATP cu macromolecula de colagen este slabă, menţinîndu-se numai în prezenţa unui exces din acest reactiv. Formarea colagenului *fibrous long spacing* (FLS) este rezultatul a două reacţii concurente, de-

Scanned with OKEN Scanner

terminate, pe de o parte de tendinţa nativă a macromoleculelor de colagen de a se orienta cu un decalaj de 1/4 din lungimea lor şi, pe de altă parte, de tendinţa anionilor adăugaţi soluţiei (alfa-glicoproteina acidă), de a reacţiona cu zone încărcate pozitiv, de intensitate similară. Din această interacţiune rezultă un aranjament antiparalel al macromoleculelor de colagen, avînd extremităţile situate la acelaşi nivel.

Mecanismul polimerizării liniare este, în parte, încă neclarificat. Unii autori susţin că agregarea cap la cap a macromoleculelor de colagen ar fi determinată, ca şi agregarea laterală, de forţele electrostatice dintre extremităţile macromoleculelor adiacente. Aceste interacţiuni ar fi favorizate de faptul că legarea cap la cap a macromoleculelor se însoţeşte şi de o suprapunere a lor pe distanţe de 30—40 Å. Substanţe cu importantă sarcină electrică, de tipul mucopolizaharidelor (de exemplu, condroitin-sulfatul) ar putea interveni în crearea acestor interacţiuni electrostatice[599]. Numeroase date, obţinute prin metode variate de investigaţie, argumentează însă implicarea, în procesul de polimerizare liniară, a unor componente particulare ale macromoleculei de colagen. Aceste componente, denumite *telopeptide*, sînt mici lanţuri polipeptidice, situate ca nişte apendici la extremitatea macromoleculei, în afara triplului helix [484]. Particularităţile constitutive ale telopeptidelor (vezi tabelul III) au fost relevate prin analiza fragmentelor eliberate consecutiv digestiei cu enzime proteolitice nespecifice (pepsină, tripsină, pronază). Au fost astfel semnalate: *a*) absenţa hidroxiprolinei şi a treoninei [916, 961]; *b*) prezenţa tirozinei în cantităţi importante, majoritatea rezidiilor tirozil din colagen fiind localizate la nivelul telopeptidelor [288]; *c*) identificarea unui compus X, probabil un aminoacid, a cărui structură nu este cunoscută în detaliu, dar care are un grup amino secundar şi comportament cromatografic similar cu ε-N-metilhidroxilizina [267]; *d*) existenţa a 3 cetoacizi, identificaţi ca acid piruvic, acid alfacetoglutaric şi acid alfa-cetoizovaleric [915]. Aceşti componenţi ai telopeptidelor conţin grupări carbonil, despre care numeroase investigaţii asupra colagenului au sugerat că participă la formarea legăturilor transversale; *e*) absenţa organizării în triplu helix şi structură specifică prin apariţia glicinei în fiecare a 2-a poziţie în lanţul polipeptidic. Glicina este încadrată de doi aminoacizi polari, de tipul asparaginei, glutaminei, lizinei, argininei şi serinei.

Eliberarea telopeptidelor prin pepsină, tripsină şi pronază reduce capacitatea macromoleculelor de colagen de a agrega cap la cap, fără a determina modificări apreciabile ale greutăţii moleculare, vîscozităţii intrinsece, rotaţiei optice, aspectului electronomicroscopic şi constituţiei chimice ale colagenului. În acelaşi timp, capacitatea de agregare laterală rămîne intactă, fiind posibilă formarea, în condiţii de mediu adecvate, a segmentelor *long spacing*. S-a dedus din aceste rezultate că macromolecula de colagen ar fi alcătuită din două părţi distincte: a) corpul central al macromoleculei, organizat în triplu helix, care reprezintă o structură rezistentă la acţiunea enzimelor proteolitice, cu excepţia colagenazelor şi b) telopeptidele, (constituind aproximativ 5 % din conţinutul proteic

Scanned with OKEN Scanner

total al colagenului [149], mici fragmente de 100—200 Å, situate la extremităţile macromoleculei, în afara triplului helix, proteazosensibile. Datorită poziţiei lor în complexul macromolecular s-a sugerat că telopeptidele ar fi structuri necolagenice.

Rolul biologic al telopeptidelor rezidă în special în participarea la mecanismele bioregulatoare ale formării fibrelor de colagen şi la proprietăţile imunologice ale colagenului.

Telopeptidele constituie unul din principalele substrate ale mecanismelor homeostatice care controlează formarea fibrelor de colagen. Ele participă atît la polimerizarea liniară a macromoleculelor de colagen, pentru a constitui protofibrilele, cît şi la formarea legăturilor intra şi intermoleculare, ce apar în cursul maturării şi îmbătrînirii colagenului. S-a constatat că prin digestia cu pepsină, care elimină telopeptidele, cea mai mare parte din componentele beta sînt convertite în lanţuri alfa, procentul primelor scăzînd de la 46 %, la 15 % [923]. Există, de asemenea, observaţii care argumentează participarea unora dintre componenţii telopeptidelor, respectiv grupările carbonilice ale cetoacizilor, tirozina, compusul X, la formarea legăturilor transversale din colagen. Astfel, s-a constatat că fluorescenţa colagenului nativ, determinată de prezenţa rezidiilor tirozinice, este modificată în cursul polimerizării şi maturării acestei proteine fibroase [353.609]. De asemenea, prin legătura bifenilică între două rezidii de tirozină, apare ditirozina, care a fost identificată drept substrat al unor legături transversale în rezilină [21], elastină [612] şi colagenul solubil [613].

Tabelul III

Conţinutul în aminoacizi al fracţiei acidosolubile a colagenului şi al telopeptidelor eliberate prin digestie cu pepsină (SCHMITT[961]).

AMINOACIZI	Mol/100 Mol aminoacizi	
	FRACŢIE ACIDOSOLUBILĂ	TELOPEPTIDE
Glicină	33,0	16,0
Hidroxiprolină	9,3	0
Prolină	14,1	7,2
Hidroxilizină	1,0	0
Tirozină	0,3	15,5
Acid aspartic	4,3	11,4
Acid glutamic	7,0	12,4
Alanină	11,2	4,0
Serină	3,2	2,8
Treonină	1,6	0,8
Valină	1,9	0,5
Metionină	0,2	0
Izoleucină	1,1	0,4
Leucină	2,2	12,6
Fenilalanină	1,5	12,0
Histidină	0,7	0,4
Lizină	2,9	0,8
Arginină	4,7	3,3

Compusul X (ε-N-metilhidroxilizina) poate fi eliberat din telopeptide prin tratarea colagenului cu pronază, în parte sub formă liberă, în parte sub forma unui pentapeptid, avînd structura gli-gli-tir--val-X. Identificarea lui nu a fost posibilă însă în colagenul neutrosolubil, considerat ca forma de colagen tînăr, nematurat, unde compusul X este înlocuit de lizină şi polipeptidele respective au secvenţa gli-gli-tir-val-liz. Se sugerează deci că acest compus apare, probabil, prin conversiunea, lizinei, iar caracterul polifuncţional evidenţiat de analiza reactivităţii chimice îl fac apt pentru construirea legăturilor transversale în colagenul care se maturează [267].

Kinetica formării fibrilelor de colagen. Posibilitatea reconstituirii *in vitro* a fibrilelor de tip nativ din soluţiile de colagen, în condiţii fiziologice de pH, concentraţie ionică şi temperatură, sugerează că elementul „informaţional", care determină formarea şi creşterea fibrilelor, există inclus în însăşi macromolecula de colagen. Procesul de fibrilogeneză se desfăşoară, din punct de vedere kinetic, în două etape [1194]: *a) etapa de nucleare*, în care nu apare precipitare evidentă a colagenului, fiind marcată printr-o perioadă de lag; în această etapă, prin agregarea macromoleculelor de colagen, se formează cele mai mici particule capabile să existe ca fază separată în sistemul colagen-solvent şi care sînt denumite nuclei; *b) etapa de creştere a nucleilor şi de apariţie a fibrilelor*, dominată de adiţia progresivă a altor macromolecule de colagen. Ambele faze sînt accelerate prin creşterea temperaturii şi a concentraţiei. O serie de agenţi extrinseci sistemului colagen-solvent pot afecta rata de formare a fibrelor, intervenind în deosebi asupra interacţiunilor electrostatice dintre macromoleculele de colagen. În acest sens acţionează polianionii de tipul mucopolizaharidelor şi a acizilor nucleici. S-a constatat astfel că heparina şi dextran-sulfaţii inhibă precipitarea; condroitin-sulfatul B, acidul hialuronic şi acidul ribonucleic nu au nici un efect, iar concentraţii reduse de condroitin-sulfat A şi C accelerează acest proces [1194]. S-a constatat, de asemenea, întîrzierea procesului de agregare fibrilară în prezenţa unor concentraţii importante de săruri anorganice. Intensitatea acestui efect depinde de natura ionilor anorganici, crescînd în ordinea următoare: SCN^-, I^-, Br^-, Cl^-, SO_4^{--}, $S_2O_3^{--}$. Cationii bivalenţi (Ba^{++}, Ca^{++}, Mg^{++}) au eficacitate mai marcată, în comparaţie cu cei monovalenţi (K^+, Na^+, Li^+) [103].

O problemă interesantă ridicată de particularităţile procesului de fibrilogeneză *in vivo* este mecanismul prin care se realizează controlul asupra dimensiunilor fibrilelor de colagen. Cum se ajunge ca, o dată atins un anumit diametru al fibrilei, acreţia laterală a unor noi molecule să nu se mai producă? Grosimea fibrilei pare să fie determinată de 2 factori şi anume: a) numărul fibrilelor care se formează şi b) relaţia între ratele relative ale polimerizării liniare şi ale agregării laterale a macromoleculelor de colagen. Datele de microscopie electronică şi difracţie la raze X sugerează că, în cursul formării fibrilelor, se produce o uşoară răsucire a unităţilor macromoleculare în raport cu axul ansamblului structural, aşa încît moleculele se acoperă parţial între ele. Gradul acestei suprapuneri

Scanned with OKEN Scanner

creşte progresiv, pe măsura creşterii diametrului fibrilelor. O dată atins un anumit diametru, acesta nu se mai modifică, deoarece, din punct de vedere energetic, apare mai favorabilă ataşarea macromoleculelor pe o fibrilă cu diametrul mai mic, decît pe una cu grosime mai mare [203].

Mecanismele de stabilizare structurală

Păstrarea integrităţii unor structuri atît de complexe ca macromoleculele de colagen şi agregatele lor fibrilare şi asigurarea exercitării funcţiilor caracteristice, poate fi explicată numai prin existenţa unor factori multipli de stabilizare structurală, a căror identificare constituie încă subiect de investigaţie. În cursul asamblării componenţilor elementari ai colagenului, în agregate de complexitate progresivă, incluzînd formarea *structurii primare* (constituţia în aminoacizi şi secvenţa caracteristică a acestora), *secundare* (formarea helixului minor ce reprezintă lanţul polipeptidic individual), *terţiare* (triplul helix al macromoleculei de colagen) şi *cuaternare* (agregarea macromoleculelor în fibrile), intervin o serie de mecanisme de stabilizare, derivînd atît din particularităţile chimice, fizico-chimice şi morfologice ale macromoleculei de colagen, cît şi din particularităţile interrelaţiilor sale cu alţi constituenţi ai ţesutului conjuctiv : glucide, proteine necolagene etc.

În limitele impuse de cunoaşterea încă incompletă a acestor mecanisme, ele sînt prezentate schematic în figurile 15, 16, 17 şi 18.

Un prim grup de factori realizează stabilitatea structurală a colagenului la nivel molecular. Dintre aceştia menţionăm :

I. **Prezenţa prolinei şi hidroxiprolinei** (fig. 15, detaliul A). Conţinutul important al acestor iminoacizi, care împreună alcătuiesc aproximativ 22 % din proteina colagenică, determină, prin inelele lor pirolidinice, o anumită rigiditate a legăturilor peptidice în a căror constituţie sînt implicate. Se creiază astfel o restricţie stereochimică, ce limitează mişcările libere de rotaţie ale lanţurilor polipeptidice în jurul axelor lor [460, 481]. S-a constatat că un lanţ bogat în prolină şi hidroxiprolină poate exista sub forma unui helix stabil în soluţie, fără intervenţia legăturilor de hidrogen, chiar la temperaturi pînă la 90°C [459]. Un factor principal prin care participă iminoacizii la stabilizarea structurală a colagenului este gruparea hidroxil a hidroxiprolinei, aptă să constituie legături de hidrogen transversale, ce conectează acest iminoacid cu o grupare carbonilică situată pe alt lanţ polipeptidic (*fig. 16*, detaliul III). Legăturile de hidrogen formate prin intermediul grupărilor hidroxil ale hidroxiprolinei sînt caracteristice pentru colagen. Particularităţile susceptibilităţii la degradare chimică şi enzimatică a legăturilor în care intră prolina şi hidroxiprolina contribuie, de asemenea, la stabilizarea structurală a colagenului. S-a arătat în paginile anterioare că normostabilitatea unui biopolimer implică atît

rezistența la factori de degradare nespecifică, cît și susceptibilitatea la acțiunea enzimelor specifice. În cazul colagenului, legăturile peptidice la

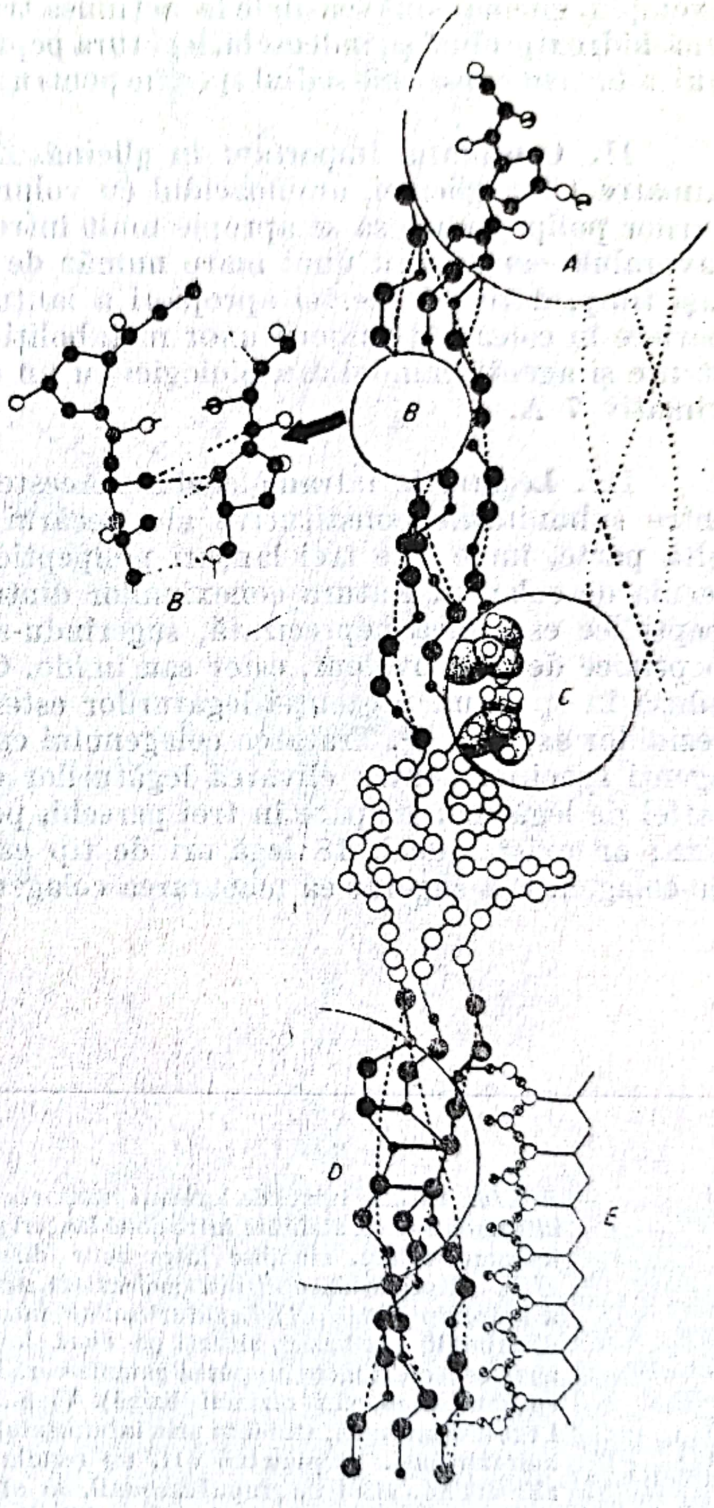


Fig. 15. Prezentare schematică a anumitor factori de stabilizare structurală a colagenului (în triplul helix, cercurile negre mai mari indică prolina sau hidroxiprolina, iar cele mai mici, glicina). A) Inele pirolidinice ale iminoacizilor, conferind o rigiditate mai marcată legăturilor peptidice și lanțurilor polipeptidice. B) Legături de hidrogen între două lanțuri polipeptidice. C) Interacțiuni hidrofobe între două catene laterale (aparținînd, de exemplu, rezidiilor leucină). D) Legături transversale de tip ionic sau covalent. E) Interacțiuni cu moleculele de apă care stabilizează configurația lanțurilor polipeptidice ale macromoleculei de colagen (CHVAPIL și DEYL[214], reprodus cu permisiunea editurii Karger, Basel, New York).

care participă iminoacizii sînt relativ nesusceptibile la hidroliza chimică nespecifică prin acizi sau alcali. De asemenea, legăturile peptidice dintre prolină și grupările carboxil ale aminoacizilor bazici sînt nesusceptibile

la proteazele nespecifice de tipul tripsinei [428], în timp ce, legăturile acestor aminoacizi bazici cu alte rezidii în afara prolinei şi hidroxiprolinei (de exemplu, glicina) sînt sensibile la acţiunea tripsinei. Secvenţele glicină-prolină-hidroxiprolină şi, îndeosebi, legătura peptidică dintre glicină şi aminoacidul adiacent constituie sediul specific pentru atacul enzimatic al colagenazei.

II. **Conţinutul important în glicină.** Existenţa în proporţie de aproximativ 1/3 a glicinei, aminoacidul cu volumul cel mai mic, permite lanţurilor polipeptidice să se apropie mult între ele, formînd structuri dense, favorabile constituirii unui mare număr de legături transversale. În acelaşi timp, datorită acestei apropieri a lanţurilor polipeptidice, se creiază bariere în calea pătrunderii unor metaboliţi intermediari sau a altor substanţe şi agenţi chimici sau biologici cu un diametru ce depăşeşte aproximativ 7 Å.

III. **Legăturile intramoleculare.** Aceste legături apar, pe de o parte, între subunităţile constitutive ale fiecărui lanţ polipeptidic, iar, pe de altă parte, între cele trei lanţuri polipeptidice care alcătuiesc macromolecula de colagen. Natura conexiunilor dintre subunităţile lanţurilor polipeptidice este încă neprecizată, sugerîndu-se existenţa unor legături nepeptidice de tip covalent, ester sau imido. O bogată argumentaţie a fost adusă în sprijinul prezenţei legăturilor ester[367], formate prin intermediul rezidiilor aspartil [135]. Tratarea colagenului cu hidroxilamină sau hidrazină, agenţi specifici pentru clivarea legăturilor ester, indică existenţa a 6 de astfel de legături, grupate în trei perechi, pentru fiecare lanţ polipeptidic alfa; ar exista, deci, 18 legături de tip ester în fiecare macromoleculă de colagen. S-a sugerat că maturarea colagenului, cu formarea di-şi trime-

Fig.16. Variate tipuri de legături transversale în colagen. I) Legături de hidrogen intramoleculare, stabilite între două lanţuri polipeptidice. II) Legăturri de hidrogen intramoleculare, stabilite între zone diferite ale aceluiaşi lanţ polipeptidic. III)Legături de hidrogen intramoleculare, stabilite prin intermediul grupării hidroxil a hidroxiprolinei. IV) Legături saline între catenele laterale ale aminoacizilor dicarboxilici şi bazici, situaţi pe două lanţuri polipeptidice diferite (în figură apar conectări între gruparea gamma-carboxilică a acidului glutamic şi gruparea epsilon-amino din rezidiul lizină). V) Formarea grupărilor amido. VI) şi VII) Legături multiple, stabilite prin intermediul grupărilor epsilon-amino ale lizinei şi hidroxilizinei. În punctul VII, un rezidiu de aminoacid este legat de grupul alfa-amino, altul de grupul carboxil, iar al treilea de grupul epsilon-amino al rezidiilor de lizină. Lanţul polipeptidic C este legat de lanţul E—E prin gruparea epsilon-amino din rezidiile de lizină. Un astfel de tripeptid, conţinînd un rezidiu lizină cu legătură la grupul epsilon-amino a fost izolat din hidrolizatele de colagen (STARY [1027], reprodus cu permisiunea editurii Springer).

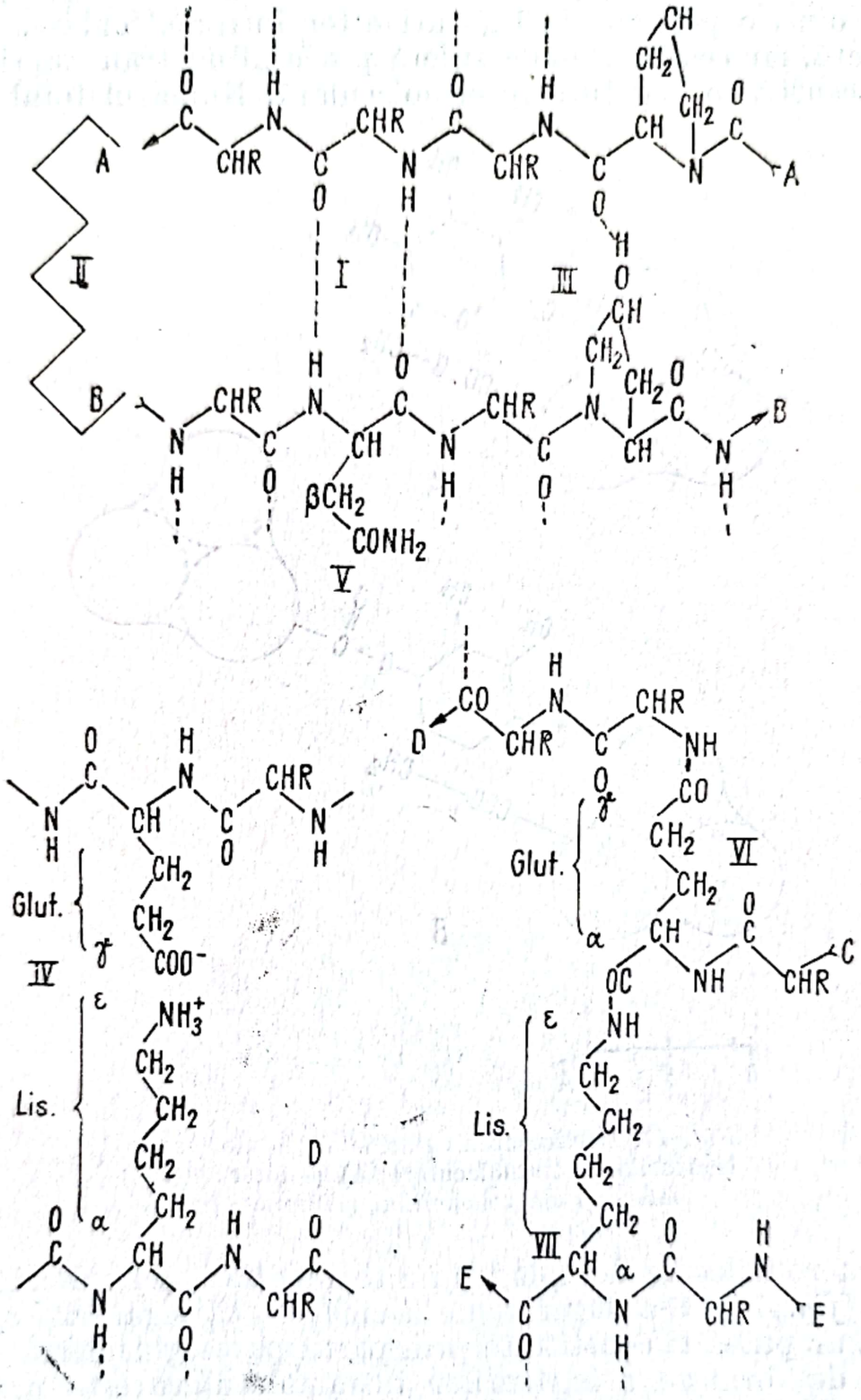


Fig. 16

rilor (componente beta şi gamma), poate rezulta şi prin intermediul unui proces de transesterificare, realizat la nivelul acestor legături în modul următor: dintr-o pereche de legături ester intramoleculare, una rămîne nemodificată, iar cea de a doua suferă procesul de transesterificare, apărînd, consecutiv, o legătură intermoleculară. Numărul total de legături

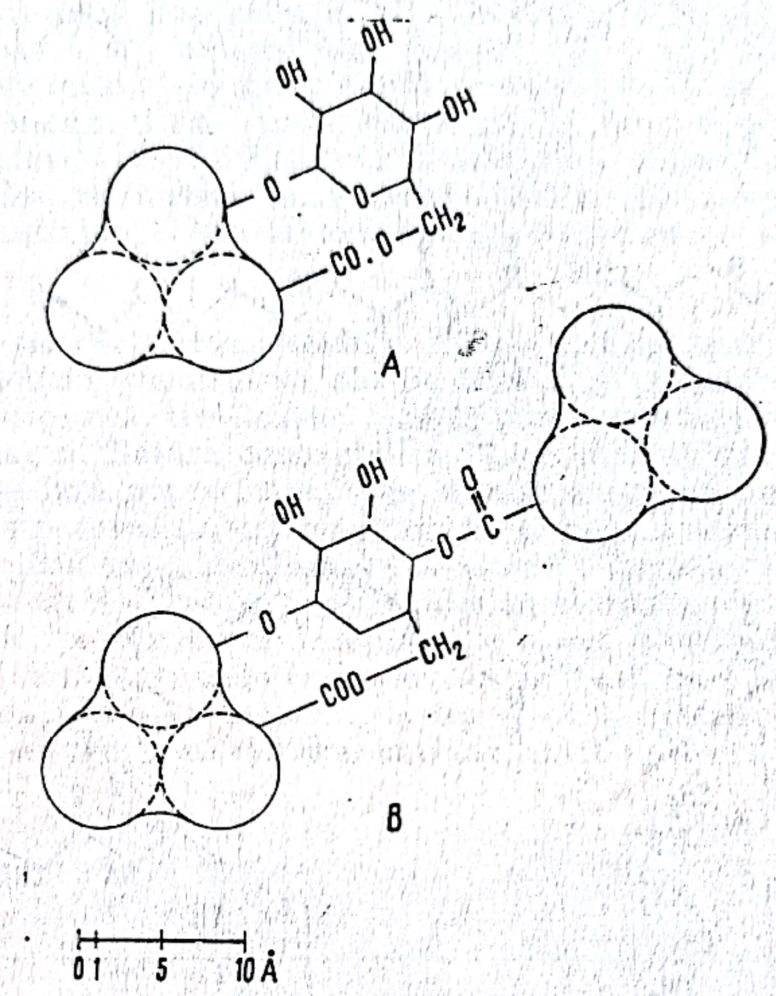


Fig. 17. Participarea glucidelor la formarea legăturilor intramoleculare (A) şi intermoleculare (B) ale colagenului (HÖRMANN[493].)

ester din macromolecula de colagen nu se modifică, schimbîndu-se numai poziţia lor (*fig. 18*). S-a sugerat, de asemenea, că legăturile ester intramoleculare, ar putea fi constituite prin participarea glucidelor [492]. Această modalitate de formare a legăturilor intramoleculare este prezentată în *fig. 17*, detaliul A. De asemenea, posibilitatea prezenţei unor legături covalente de tip imido (*fig. 16*, detaliul V) trebuie luată în considerare, întrucît şi această categorie de legături este sensibilă la agenţii nucleofilici (hidroxilamina şi hidrazina), care clivează legăturile ester [135]. Legăturile intramoleculare dintre lanţurile polipeptidice reprezintă unul din principalii factori de stabilizare a macromoleculei de colagen. Constitui-

rea unui număr progresiv crescînd de astfel de legături este urmată de insolubilizarea treptată a colagenului, cu apariţia dimerilor beta şi a trimerilor gamma. Se consideră că cea mai mare parte dintre conexiunile stabilite între lanţurile macromoleculei de colagen sînt reprezentate prin legături de hidrogen, formate între atomul de hidrogen dintr-un

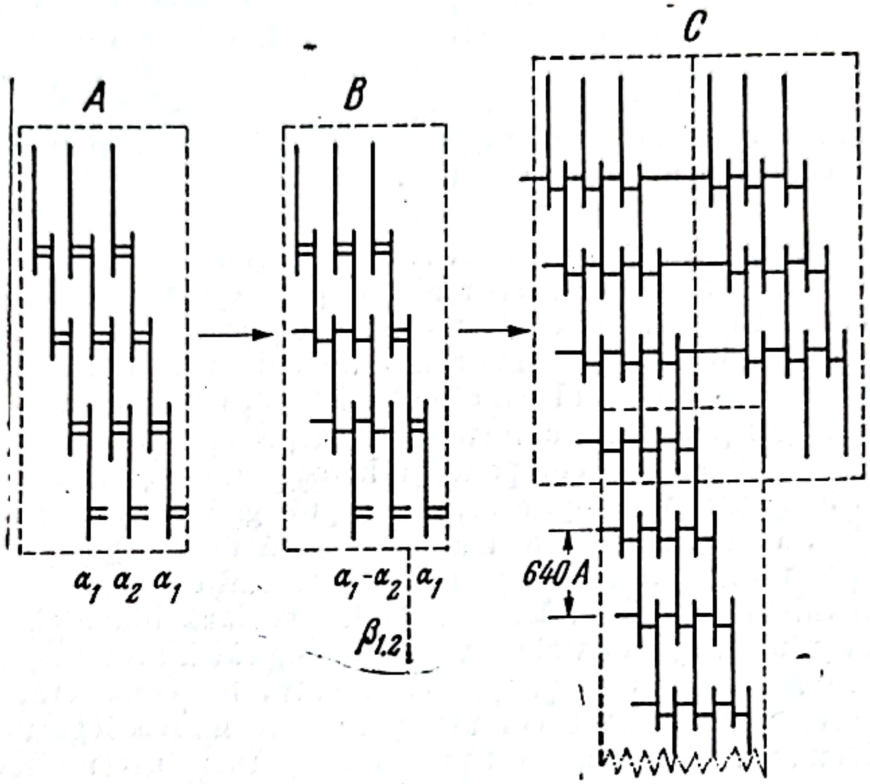


Fig. 18. Schema etapelor de maturare a colagenului, cu creşterea progresivă a stabilităţii structurale, ca urmare a înmulţirii numărului legăturilor transversale. A) Macromoleculă de colagen fără legături intramoleculare între lanţurile polipeptidice alfa$_1$ şi alfa$_2$. B) Proces incipient de conectare, prin legături transversale intramoleculare, a lanţurilor polipeptidice, rezultînd formarea dimerilor beta. C) Proces avansat de conectare, prin legături intra- şi inter- moleculare, rezultînd formarea trimerilor gamma şi apariţia stabilităţii structurale, caracteristică macromoleculei de colagen (GALLOP [366], reprodus cu permisiunea editurii J. A. Churchill).

grup amino situat pe un lanţ şi atomul de oxigen dintr-un carbonil situat pe un lanţ vecin (*fig. 15*, detaliul B; *fig. 16*, detaliul I). Acest tip de legături acţionează pe o distanţă de 2—3 Å şi sînt puţin stabile, putînd fi clivate uşor prin factori denaturanţi cu acţiune blîndă, sum ar fi căldura, ureea, guanidina. Dacă se elimină agentul denaturant, lanţurile separate se reunesc şi se reformează macromolecula de colagen. S-a arătat că în cursul biosintezei colagenului, legăturile transversale intramoleculare joacă rolul de centri de nucleare. O dată cu apariţia unui astfel de centru, dezvoltarea şi stabilizarea triplului helix se realizează rapid[9 51]. 49

Pe măsura maturării colagenului apar între lanţuri legături mai stabile, probabil de tip covalent, a căror clivare mult mai dificilă antrenează insolubilizarea treptată a colagenului. Distribuţia legăturilor intramoleculare este neuniformă; se consideră că lanţul $alfa_2$ este implicat îndeosebi în aceste legături, pe cînd lanţurile $alfa_1$ participă şi la conexiunile intermoleculare [1094]. Formarea legăturilor transversale intramoleculare pare să fie influenţată de reducerea aportului alimentar, rezultînd un colagen în care este afectat numărul legăturilor dintre lanţurile $alfa_1$ şi $alfa_2$ şi dintre lanţurile $alfa_1$-$alfa_1$ [210]. Se sugerează că aportul alimentar diminuat reduce cantitatea de grupări carbonilice, prin modificarea conţinutului în cetoacizi a colagenului [269].

IV. Legăturile intermoleculare. Asamblarea macromoleculelor de colagen pentru formarea fibrilelor este realizată prin legăturile intermoleculare. Studiul legăturilor transversale intermoleculare prezintă numeroase dificultăţi metodologice, întrucît ele apar într-un substrat insolubil, existenţa lor fiind evidenţiată prin probe indirecte. Astfel, denaturarea colagenului insolubil prin agenţi chimici determină apariţia unor fracţiuni caracterizate cromatografic drept componenţi $beta_{2.2}$ [147], ca şi a unor agregate formate din 3 lanţuri polipeptidice, de tipul $gamma_{1.1.1}$, $gamma_{2\,2.2}$ şi $gamma_{1.2.2}$ [1094]. Întrucît fiecare macromoleculă de colagen conţine două lanţuri $alfa_1$ şi un lanţ $alfa_2$, aceşti compuşi includ cu certitudine legături transversale intermoleculare. Densitatea lor variază îndeosebi în funcţie de tipul ţesutului conjunctiv şi de vîrsta biologică. Natura legăturilor intermoleculare a fost numai parţial clarificată. Se consideră, totuşi, că există numeroase mecanisme comune pentru formarea legăturilor intra- şi intermoleculare. Principalele tipuri de legături intermoleculare care conectează macromoleculele de colagen, realizînd o reţea multiplă de lanţuri polimerice ce alcătuiesc fibrilele şi fibrele conjunctive sînt:

1. *Legăturile de hidrogen* ce au ca surse potenţiale pentru constituirea interconectării macromoleculare grupările hidroxil ale serinei, treoninei, hidroxiprolinei, hidroxilizinei şi tirozinei. Majoritatea legăturilor de hidrogen implică gruparea hidroxil a hidroxiprolinei şi grupările cetoimide ale aminoacizilor din macromolecula adiacentă de colagen. Acest tip de legături acţionează pe distanţe de 2—3 Å.

2. *Legăturile ionice* (saline) acţionează pe distanţa de 10—100 Å şi apar între grupele cu sarcini opuse, situate în regiunile amorfe a două lanţuri polipeptidice diferite, ca şi în zonele terminale (regiunile telopeptidice) ale acestor lanţuri (*fig. 15*, detaliul B; *fig. 16*, detaliul IV). Grupările bazice sînt în general reprezentate de catenele laterale ale lizinei, histidinei, argininei si tirozinei, iar grupările acide, de aminoacizii dicarboxilici (acidul aspartic şi acidul glutamic). Prezenţa legăturilor saline este sugerată de faptul că rezidiile aminoacizilor bazici şi dicarboxilici din colagen nu sînt evidenţiabile direct, prin titrare acidimetrică. S-a constatat însă că nu toate rezidiile aminoacizilor dicarboxilici sînt disponibile pentru legături saline, o parte din grupările lor carboxil fiind

Scanned with OKEN Scanner

convertite în carboxil-amide, al căror rol în formarea legăturilor intramoleculare a fost menţionat în paginile anterioare. Un tip particular al legăturilor ionice intermoleculare, constituind o caracteristică structurală a colagenului, este reprezentat de conexiunea dintre gruparea epsilon-amino a rezidiului lizină şi gruparea gamma-carboxil a acidului glutamic (*fig. 16*, detaliul VI şi VII). Existenţa acestei legături a fost demonstrată prin evidenţierea sa în structura tripeptidului Nε — (glicil-alfa glutamil)— lizină, care a fost izolat din hidrolizatele acide de colagen.

Atît legăturile de hidrogen, cît şi legăturile ionice pot fi considerate ca interacţiuni între grupe polare, diferenţiindu-se prin faptul că grupările care participă la constituirea lor sînt, sau nu sînt, ionizate.

3. *Legăturile hidrofobe* (*fig. 15*, detaliul C) se formează între catenele laterale ale aminoacizilor apolari, de tipul valinei, leucinei, izoleucinei şi fenilalaninei. Aceste grupări au o afinitate redusă pentru apă şi prezintă tendinţa de a se orienta spre interiorul agregatelor macromoleculare, stabilind un număr maxim de contacte avantajoase prin apropierea lor.

4. *Legăturile covalente* (*fig. 15*, detaliul D). Legăturile de hidrogen, ionice şi hidrofobe sînt necovalente, predominînd în fibrilele de colagen tinere; pe măsura maturării acestora, apare un număr tot mai important de legături covalente, stabilite atît între macromoleculele de colagen agregate în fibrile, cît şi între aceste fibrile şi variaţi alţi constituenţi ai ţesutului conjunctiv : proteine necolagene, complexe mucopolizaharidoproteice, glucide neutre (reprezentate prin glucoză, galactoză sau dizaharidul glucoză-galactoză), glicoproteine etc. [184, 266, 493, 714, 906]. În acest grup au fost menţionate legături de tip ester sau esterglicozidic, de tipul bazelor Schiff sau legături imido. Legăturile covalente sînt în general conexiuni ferme, determinînd o importantă stabilizare a structurilor colagenice. Creşterea considerabilă a numărului lor în procesele de maturare a acestor structuri antrenează formarea unei reţele tridimensionale de lanţuri polipeptidice, reflectată prin proprietăţile funcţionale particulare ale acestui tip de colagen şi prin insolubilizarea sa.

5. *Legături prin intermediul moleculelor de apă* (*fig. 15*, detaliul E). Acest tip de conexiuni participă la stabilizarea structurii cuaternare a colagenului, respectiv a macromoleculelor agregate în fibrile [461]. Deşi macromoleculele de colagen nu au configuraţie liniară, asamblarea lor în fibrile realizează un anumit grad de liniaritate. Studiile de rezonanţă magnetică nucleară relevă că această liniaritate este favorizată de interpunerea lanţurilor de molecule de apă, între macromoleculele de colagen adiacente[106].

SINTEZĂ

Deşi se acceptă în general că mecanismul de sinteză a macromoleculei de colagen este similar cu cel al altor tipuri de proteine, această afirmaţie trebuie limitată numai la etapele mari ale procesului de sinteză.

Astfel, în cadrul biogenezei colagenului, ca şi a proteinelor în general, are loc o primă etapă de „activare" a aminoacizilor din citoplasma celulelor şi încorporarea acestor aminoacizi liberi în complexe enzimă-aminoacil-adenilat, în prezenţa adenozintrifosfatului şi a enzimelor activatoare. Sursa aminoacizilor ce suferă procesul de „activare" este foarte variată: glicina ia naştere din serină; serina şi alanina au ca precursor acidul piruvic şi surse nespecifice de azot; prolina apare din acidul glutamic, care, la rîndul său, ia naştere din acidul alfa-cetoglutaric. În ceea ce priveşte aportul exogen, sînt necesare numai cantităţi extrem de mici ale unor acizi aminaţi esenţiali aromatici de tipul tirozinei, triptofanului sau histidinei. Un aspect particular al sintezei de aminoacizi a fost semnalat în protoplasma osteoblaştilor. Aceste celule necesită, spre a elabora colagen, un consum extrem de redus de oxigen şi o mare cantitate de glucoză. Studii cu radioizotopi au permis să se constate că o proporţie de 50—80% din glucoza marcată este convertită în acid lactic şi că cea mai mare parte a radioizotopilor rămîn în celulă [334]. Ulterior, marcajul este evidenţiat în alanină, acid glutamic, acid aspartic, glicină, prolină, apoi în lanţul polipeptidic al macromoleculei de colagen, unde şi hidroxiprolina poate fi identificată pe baza prezenţei radioizotopilor. Aceste observaţii sugerează capacitatea osteoblastului de a sintetiza colagen, plecînd de la glucoză.

Aminoacizii activaţi sînt apoi transferaţi pe o fracţie a acidului ribonucleic solubil (de transfer, sau acceptor), cu care alcătuiesc un complex aminoacil-ARN de transfer. Ataşarea aminoacidului la ARN se face tot ca urmare a unei catalize enzimatice şi tot prin intermediul grupării carboxil, esterificată la componenta riboză terminală a ARN-ului solubil.

În sfîrşit, acest complex este transferat pe ribozomi, unde aminoacizii se unesc prin legături peptidice, în secvenţa codificată de ARN mesager. De la această etapă, sinteza colagenului începe să se deosebească de cea a proteinelor în general, prin apariţia unor aspecte particulare ale procesului de biogeneză, reprezentate de: *a*) formarea unor aminoacizi hidroxilaţi (hidroxiprolina şi hidroxilizina) care nu existau în stare liberă în citoplasma celulei; *b*) elaborarea, la nivelul microzomilor, a trei lanţuri polipeptidice, dintre care două cu un conţinut diferit în aminoacizi; *c*) necesitatea alcătuirii unor mari agregate ribozomiale, denumite polizomi, capabile să permită interconectarea celor trei lanţuri polipeptidice într-o macromoleculă unică, cunoscută sub denumirea de tropocolagen, din a cărei polimerizare liniară ar rezulta structurile fibrilare elementare.

Obţinerea datelor privind particularităţile biogenezei colagenului a fost posibilă ca urmare a analizei procesului de sinteză, în special în acele sisteme biologice în care are loc o elaborare masivă şi rapidă a macromoleculei de tropocolagen, cum ar fi: embrionul în dezvoltare, culturile de ţesuturi de fibroblaşti, cendroblaşti şi osteoblaşti, granuloamele de diferite origini, plăgile în curs de cicatrizare, uterul pre- şi post partum. Investigaţiile efectuate în acest domeniu timp de două decenii au pus pe primul plan al sintezei colagenului procesul de hidroxilare a prolinei în hidroxiprolină, considerat ca etapa cea mai caracteristică a stadiului de

Scanned with OKEN Scanner

sinteză şi cea mai importantă de modelat prin mijloace terapeutice. Drept urmare, vom insista în mod special asupra cunoştinţelor ce s-au acumulat în jurul acestui subiect.

Hidroxilarea prolinei

Teoretic, hidroxilarea prolinei s-ar putea produce în stadiile următoare: *a*) proliladenilat, respectiv în faza de aminoacid activat; *b*) prolină legată de ARN de transfer; *c*) peptid format în ribozomi; *d*) polipeptid desprins din matricea ribozomială. Tot teoretic se poate afirma că acelaşi pool de prolină poate fi folosit atît pentru aminoacidul ce rămîne ca atare în lanţul polipeptidic al colagenului, cît şi pentru cel care suferă hidroxilarea; se susţine, de asemenea, că ar exista două pooluri specifice de aminoacizi prolină, unul servind ca sursă a prolinei ce rămîne nemodificată, altul a prolinei ce va suferi hidroxilarea.

Hidroxilarea rezidiilor prolil spre a forma hidroxiprolina, aminoacidul caracteristic colagenului, este un proces enzimatic, catalizat de o oxidază cu funcţie mixtă, implicînd prezenţa unui substrat specific peptidil-prolină, a oxigenului atmosferic, a acidului ascorbic, a alfa-cetoglutaratului şi a ionului feros [520]. Acest substrat poate fi preparat prin incubarea cu prolină marcată a ţesuturilor care elaborează colagen, asigurîndu-se, în acelaşi timp, o inhibare a enzimei oxidante [677]. Denumirea cea mai des utilizată pentru această enzimă este de: colagen-prolin-hidroxilază. Modul de acţiune a enzimei apare foarte evident din analiza produşilor de degradare ai substratului sintetic (gli-pro-pro). Dacă acest substrat este supus digestiei cu colagenază, apare tripeptidul gli-pro-pro aşa cum a fost introdus în mediul de incubaţie; dacă substratul stă în contact cu colagen-prolin-hidroxilaza, apare secvenţa gli-pro-hipro, ca urmare a hidroxilării prolinei în hidroxiprolină [519]. Strînsa corelaţie între acţiunea colagen-prolin-hidroxilazei şi cantitatea de prolină hidroxilată a dus la concluzia că toţi factorii care modifică activitatea enzimei influenţează, în mod indirect, formarea colagenului. În acest sens ar putea interveni anaerobioza, deficitul de acid ascorbic, o stimulare prea rapidă a biosintezei, toţi aceşti factori putînd duce la diminuarea cantităţii de hidroxiprolină din colagenul elaborat, cu toate alterările de stabilitate structurală, menţionate anterior. În condiţii fiziologice ale activităţii enzimatice este probabil că anumite rezidii prolil sînt mai rapid hidroxilate decît altele, rezultînd secvenţe hidroxilate complet, şi altele doar parţial; acest proces pare a fi condiţionat de capacitatea enzimei de a „recunoaşte" rezidiile de prolină ce trebuiesc oxidate şi cele care rămîn ca atare. Anumite date tind să sugereze că procesul de hidroxilare ar fi independent de conformaţia precursorului, apărînd cu o egală intensitate atît la forma nativă, cît şi la cea denaturată prin căldură [807]. În schimb, pare necesară o anumită secvenţă specifică în structura primară a precursorului macromoleculei de colagen, respectiv gli—X—pro—gli—X—Y (X

şi *Y* fiind adesea prolină sau alanină). În colagenul de la majoritatea speciilor studiate, hidroxiprolina se găseşte în poziţia *Y* a unităţilor repetabile tripeptidice (gli — X — *Y*) din zonele apolare ale macromoleculei, în poziţia X predominînd prolina [452]. Prolina nu a fost întîlnită niciodată în poziţia III, şi nici hidroxiprolina în poziţia II. Această secvenţialitate constantă ar explica posibilitatea enzimei de a „recunoaşte" lanţul sau fragmentul de lanţ peptidic ce trebuie hidroxilat, după cum colagenaza „recunoaşte" aceeaşi secvenţă spre a desface o anumită legătură peptidică, degradînd macromolecula de colagen.

În afara secvenţialităţii, gradul de hidroxilare pare să fie dependent şi de lungimea lanţului peptidic, tratamentul cu substanţe care rup parţial acest lanţ (acid tricloracetic, de exemplu) diminuînd considerabil rata transformării prolinei în hidroxiprolină.

Precizarea acţiunii de oxigenază a colagen-prolin-hidroxilazei a fost obţinută numai după sintetizarea prolinei di-tritiate şi, apoi, a prolinei cis- şi trans-4-monotritiate, demonstrîndu-se că numai atomul de tritiu trans faţă de gruparea carbonil, se pierde în cursul hidroxilării [356]. Oxigenul hidroxilului ar deriva din fixarea directă a O_2 molecular [354, 879]. Fixarea O_2 se face cu pierderea unui singur H din prolină; această deplasare unică de protoni duce la păstrarea configuraţiei şi este considerată similară hidroxilărilor steroizilor. S-a mai afirmat că această enzimă este o oxidază cu funcţie mixtă [709], întrucît implică participarea atît a O_2 molecular, cît şi a unui agent reducător. Faptul că în cele mai multe sisteme biologice acest agent reducător este reprezentat de acidul ascorbic, creează importante perspective de a interveni terapeutic în stimularea sau inhibarea procesului de sinteză a colagenului.

Un alt factor important în procesul de hidroxilare este ionul feros, agenţii chelanţi ai fierului inhibînd formarea hidroxiprolinei [510]. Acţiunea agenţilor chelanţi antrenează modificarea compoziţiei în aminoacizi a lanţului peptidic, prin inhibarea formării hidroxiprolinei şi creşterea bogăţiei în prolină, fără a influenţa codul genetic. În astfel de condiţii, sinteza colagenului ca macromoleculă nu pare alterată, deşi se formează lanţuri polipeptidice cu un patern modificat al aminoacizilor [511].

Analiza modului de acţiune a colagen-prolin-hidroxilazei a permis să se constate că preparatele de enzimă devin inactive prin dializă, datorită pierderii unui cofactor; în astfel de condiţii cataliza nu a mai putut fi restabilită, indiferent de cantitatea de acid ascorbic sau ioni feroşi administrată. Acest cofactor a fost izolat şi identificat drept alfa-cetoglutarat [520]. El acţionează fie ca un activator alosteric, fie ca un modificator al conformaţiei sau al stării de agregare a enzimei. În acelaşi timp, el este un intermediar cheie în ciclul acizilor tricarboxilici şi în metabolismul aminoacizilor, inclusiv în căile de biosinteză ale prolinei [729]. Ipoteza funcţionării lui ca activator alosteric ar putea explica existenţa unui mecanism de sincronizare între activitatea colagen-prolin-hidroxilazei şi biosinteza proteinelor necolagene. În lumina datelor de mai sus, s-ar putea sugera următoarea schemă a reacţiei catalizată de colagen-prolin-

Scanned with OKEN Scanner

hidroxilază : peptidil-prolină + acid ascorbic + O_2 $\xrightarrow[\text{ion feros}]{\text{alfa-cetoglutarat}}$ → peptidil-hidroxiprolină + dehidroascorbat + H_2O

Cînd reacţia de hidroxilare este inhibată, s-a constatat, în culturi de ţesuturi, că celulele sintetizează un precursor bogat în prolină şi lizină, dar fără hidroxiprolină şi hidroxilizină. Acest precursor, denumit protocolagen [543], dacă este pus în contact cu prolin-hidroxilaza, ar servi ulterior ca substrat pentru formarea hidroxiprolinei şi hidroxilizinei.

În concluzie se poate afirma, pe baza celor mai multe rezultate publicate în acest domeniu, că în sinteza colagenului ar interveni, ca mecanism particular, activarea prolinei şi legarea ei de ARN-ul solubil respectiv, apoi ataşarea lui la un ribozom în care sînt legaţi succesiv aminoacizii în secvenţa caracteristică lanţului peptidic al colagenului. Cînd peptidul din ribozomi atinge o dimensiune anumită şi conţine secvenţele adecvate spre a fi „recunoscut" de enzimă, anumite rezidii prolină sînt hidroxilate în hidroxiprolină de către o colagen-prolin-hidroxilază. În prezenţa acestei enzime şi a cofactorilor, hidroxilarea pare să fie corelată cu intensitatea procesului de sinteză proteică, astfel încît, în momentul în care lanţul polipeptidic este total format, el apare şi total hidroxilat. S-a sugerat chiar că rata de hidroxilare ar constitui un factor de control în sinteza colagenului [843]. Proporţionalitatea între activitatea colagen-prolin-hidroxilazei şi rata sintezei colagenului ar putea fi datorită : *a*) factorilor limitativi care operează la nivelul transcripţiei sau translaţiei ARN mesager necesar sintezei enzimei ; *b*) factorilor inhibitori ai activităţii enzimatice ; *c*) turnoverul diferit al celor două tipuri de proteine [390]. În schimb, se consideră că transferul în celule al ARN mesager, necesar codificării lanţului polipeptidic al colagenului, reprezintă un proces independent de cel de hidroxilare a prolinei [518]. Aşa s-ar explica de ce se poate forma în continuare un colagen „atipic", bogat în prolină şi lizină, şi sărac în hidroxiprolină şi hidroxilizină, atunci cînd sînt blocate selectiv mecanismele de hidroxilare. Acest colagen atipic este degradat mult mai rapid de către colagenază (aproximativ de 5 ori mai repede), în comparaţie cu cel care conţine cantităţi normale de hidroxiprolină. Apare astfel posibilitatea ca, în anumite condiţii nefiziologice, celulele să elaboreze un colagen cu grad mai redus de stabilitate structurală, exemplele cele mai demonstrative în acest domeniu apărînd din studiul scorbutului experimental. Diminuarea stabilităţii structurale ar rezulta din absenţa hidroxiprolinei, absenţă ce reduce considerabil posibilităţile de formare a legăturilor de hidrogen de tip OH....OC, legături ce par a juca un rol important în formarea triplului helix [433]. În sfîrşit, ar mai fi de menţionat că macromolecula de colagen elaborată cu un deficit de hidroxiprolină pare mai susceptibilă să fie degradată de proteaze nespecifice.

Se acceptă că acelaşi tip de colagen-prolin-hidroxilază catalizează hidroxilarea prolinei în lanţurile polipeptidice $alfa_1$ şi $alfa_2$ ale triplului

helix, după cum se sugerează că aceeaşi enzimă ar fi responsabilă şi de hidroxilarea lizinei în hidroxilizină.

Hidroxilarea lizinei

Procesul de hidroxilare a lizinei are loc, probabil, în ribozomi, fiind caracterizat prin ataşarea unui grup hidroxil la C_5 al lizinei. Studii utilizînd lizină 4.5-ditritiată ca precursor al hidroxilizinei, sugerează că hidroxilarea apare prin adiţia directă a unui atom de O la C_5 al aminoacidului [866]. „Recunoaşterea" de către enzimă a lizinei ce va fi hidroxilată pare să fie condiţionată de secvenţa locală a aminoacizilor adiacenţi lizinei [182].

Ca şi la hidroxiprolină, hidroxilarea este dependentă de prezenţa oxigenului. Astfel, pe măsură ce osul se maturează în cursul dezvoltării embrionare şi aportul circulator scade, se reduce şi cantitatea de hidroxilizină din colagenul matricei osoase [746]. În plus, apar diferenţe cantitative ale conţinutului în hidroxilizină între lanţurile $alfa_1$ şi $alfa_2$, şi chiar între lanţurile $alfa_1$ între ele, sugerînd variabilitatea procesului de hidroxilare la nivelul aceleiaşi macromolecule [182]. Se pare că enzima denumită colagen-lizin-hidroxilază ar fi similară colagen-prolin-hidroxilazei, fiind supusă acţiunii aceloraşi factori inhibitori şi implicînd prezenţa aceluiaşi cofactor, ca şi în cazul sintezei hidroxiprolinei. Activitatea ei se exercită, pînă la un anumit punct, independent de procesul de formare a lanţurilor polipeptidice, modificările translaţiei neinfluenţînd imediat şi apreciabil hidroxilarea.

Cînd reacţiile de inhibare sînt intense, apare blocată atît formarea hidroxiprolinei, cît şi a hidroxilizinei, deşi lanţul polipeptidic continuă să fie elaborat. Analiza acestui proces de blocare a dus la constatarea că anumite substanţe opresc preferenţial formarea hidroxiprolinei, iar altele formarea hidroxilizinei.

Asamblarea ribozomilor

S-a demonstrat că elaborarea anumitor proteine globulare sau fibroase se însoţeşte de un proces de asamblare a ribozomilor prin intermediul acidului ribonucleic mesager, rezultînd poliribozomi sau polizomi; acest proces a fost evidenţiat şi în sinteza cologenului [676]. O moleculă de ARN mesager, putînd conecta 6-8 ribozomi, conţine informaţia genetică capabilă să secvenţializeze un număr de 150 — 300 de rezidii de aminoacizi [594, 703]. Raportînd aceste date la colagen, care conţine în fiecare lanţ polipeptidic aproximativ 1 000 de aminoacizi, rezultă că, pentru fiecare lanţ $alfa_1$ sau $alfa_2$, vor trebui interconectaţi sub formă de polizomi, 30 — 35 de ribozomi individuali şi cel puţin 100 de ribozomi, spre a da naştere triplului helix.

Scanned with OKEN Scanner

Considerînd ca posibilă cuprinderea întregii informaţii genetice, necesare formării macromoleculei de tropocolagen, în polizomii alcătuiţi din minimum 100 de ribozomi, rămîne să fie precizată modalitatea prin care ARN mesager codifică acest imens complex ribozomal, precum şi factorii care asigură stabilitatea interconectării ribozomilor.

Ipoteza cea mai uşor de admis, privind modul cum se face informaţia genetică, este aceea a subunităţilor. Fiecare moleculă de ARN mesager ar reuni un număr limitat de ribozomi, rezultînd fragmente de lanţuri peptidice cu greutăţi moleculare sub 20 000. Astfel, de exemplu, polizomi formaţi din 5—7 ribozomi dau naştere la subunităţi ale lanţurilor polipeptidice ale colagenului, cu greutate moleculară variind între 11 000 şi 17 00 [320]. Din interconectarea ulterioară a fragmentelor de lanţ polipeptidic rezultă şi o stabilizare a grupelor de ribozomi, prin intermediul produsului sintetizat. Digestia cu ribonuclează determină o împrăştiere a ribozomilor uniţi în grupuri mici şi legaţi prin intermediul ARN mesager, dar nu mai are efect asupra marilor agregări de polizomi ce sînt conectaţi prin lanţurile polipeptidice. Dimpotrivă, digestia cu colageneză va degrada arhitectura polizomilor, o dată cu aceea a triplului helix şi nu va afecta interconectarea micilor agregate ribozomale. Alte studii în acest domeniu evidenţiază, de asemenea, existenţa de subunităţi în lanţurile polipeptidice ce se formează, subunităţi care, în funcţie de rapiditatea apariţiei lor în cursul degradării lanţurilor, ar avea greutăţi moleculare de 8 000, 18 000 şi 34 000.

În afara acestor ipoteze, larg acceptate în literatura de specialitate, se mai ia în considerare şi posibilitatea ca ARN mesager să fie policistronic, codificînd în acelaşi timp pentru mai multe tipuri de proteine. Sinteza concomitentă, în fibroblaşti, a proteinelor necolagene şi colagene, a tropocolagenului şi a enzimelor sintetizante, ar sugera că numai o parte din polizomii identificaţi ar fi orientaţi spre elaborarea lanţurilor polipeptidice ale triplului helix.

În legătură cu aceste date reluăm şi unele aspecte ale problemei hidroxilării prolinei şi lizinei. *In vitro*, precursorul peptidic cu o greutate moleculară de 4 000 este mult mai slab hidroxilat decît cel cu greutatea moleculară de 15 000, mai ales dacă, la ultimul, a apărut şi dispoziţia helicoidală a lanţului peptidic [543].

Pentru ca hidroxilarea să fie eficientă se acceptă o greutate moleculară minimă de 10 000; aceasta ar corespunde cifrei minime a greutăţii moleculare a subunităţilor codificate de o moleculă de ARN mesager după ce a conectat 5—6 ribozomi. Ar rezulta că hidroxilarea începe după asamblarea acestor subunităţi, existînd secvenţialitatea necesară pentru ca enzima să „recunoască" substratul. Pentru aceeaşi ipoteză pledează şi constatarea că hidroxilarea poate continua după incubaţia cu ribonuclează, întrucît există un lanţ peptidic preformat care rămîne stabil după eliminarea ARN mesager ce l-a codificat. În schimb, hidroxilarea nu mai apare după digestia cu colagenază, sugerînd că această enzimă „recunoaşte" pentru degradare acelaşi substrat pe care îl catalizează colagen-hidroxilaza.

Scanned with OKEN Scanner

Aspecte celulare ale sintezei colagenului

FIBROBLASTUL

Observaţii efectuate *in vitro* au demonstrat că o cantitate de 10^7 de celule sintetizează, pe zi, în medie, 5,16 μg de colagen şi 100—200 μg de acid hialuronic [421]. Anumite tipuri de fibroblaşti (3T3) pierd capacitatea de a elabora colagen în cursul trecerilor succesive în culturi, dar continuă să sintetizeze acid hialuronic. De asemenea, anumiţi fibroblaşti nu mai sintetizează colagen dacă sînt scoşi din mediul natural şi crescuţi în monolayer pe lame de sticlă, dar îşi recapătă capacitatea de sinteză în momentul cînd sînt reintroduşi în organism [876]. *In vitro*, ritmul sintezei pare evident influenţat de concentraţia H-ionilor din mediul de cultură. Prin adiţia de acid lactic, sinteza de proteine necolagene scade şi creşte cea de colagen; aceste date au sugerat ipoteza că produşii rezultaţi din metabolismul fibroblaştilor însăşi ar putea controla, pînă la un anumit nivel, gradul diferenţierii funcţionale a fiecărui element în parte [420]. Un alt factor ce influenţează, *in vitro*, elaborarea colagenului este densitatea fibroblaştilor. Cînd această densitate atinge limita saturaţiei culturilor, cantitatea de colagen sintetizată se ridică la 3—3,5 % din totalul proteinelor, în timp ce, în celulele fiice, dispersate la periferia culturii, sinteza scade la 0,25 % [420], revenind la procentajul maxim cînd saturaţia culturii cu celule atinge, din nou, valoarea maximă.

Dintre toate organitele fibroblastului, reticulul endoplasmic prezintă cele mai nete modificări în timpul diferenţierii şi activităţii celulei. La elementul activ, acest organit este alcătuit din tuburi şi cisterne, cu o mare bogăţie de granule de ribonucleoproteine în pereţii lor. Dimpotrivă, la celula inactivă, reticulul endoplasmic diminuă considerabil, revenind la marea dezvoltare din elementul activ dacă se creează condiţiile unei dezvoltări rapide a fibroblaştilor.

După administrarea de prolină marcată, radioizotopul apare în reticulul endoplasmic la un interval de numai 15 minute, iar la 30 de minute atinge concentraţia maximă. Această perioadă de timp include „activarea" aminoacidului, legarea lui cu ARN de transfer şi formarea de legături peptidice în subunităţile ce iau naştere în micile aglomerări de ribozomi. Apoi, particulele se scurg spre aparatul Golgi, unde devin foarte abundente după 60 de minute. Această trecere, de la reticulul endoplasmic la aparatul Golgi, ar marca formarea macromoleculei de tropocolagen în polizomi şi, apoi, deplasarea macromoleculelor spre veziculele Golgi, unde ar avea loc primele agregări sub formă de filamente. Urmează un proces de eliminare progresivă a macromoleculelor şi filamentelor, astfel încît, la 140 de minute de la administrare, toată cantitatea de radioizotop de găseşte în afara celulei [911]. În cadrul procesului de eliminare pot fi vizualizate imagini sugerînd deplasări de mici vezicule ale aparatului Golgi spre periferia celulei, unde îşi varsă conţinutul în exterior, iar membrana veziculei se contopeşte cu membrana celulară.

Scanned with OKEN Scanner

Afirmaţia că reticulul endoplasmic constituie organitul unde este sintetizat colagenul, iar aparatul Golgi organitul unde este stocat şi suferă primele polimerizări, este acceptată de tot mai mulţi cercetători. Desigur că există şi posibilitatea ca macromolecule izolate de tropocolagen să fie direct eliminate la exterior prin canalele reticulului endoplasmic, fără să mai treacă prin aparatul Golgi. În această eventualitate, celula elimină colagenul în soluţie, sub formă nepolimerizată. Trecerea prin aparatul Golgi ar conferi deci tropocolagenului un anumit grad de stabilitate structurală, rezultat din agregarea cap la cap a macromoleculelor; este posibil ca şi conectarea glucidelor să aibă loc tot la acest nivel, această conectare fiind strîns corelată cu agregarea macromoleculelor.

Evidenţierea, în fibroblaştii de embrion şi din granuloamele experimentale, a unor filamente submicroscopice, cu diametrul constant în jur a 50 Å, a reactualizat problema formării intracelulare a fibrilelor. Aceste filamente se acumulează uneori atît în reticulul endoplasmic, cît şi în aparatul Golgi, fiind împinse apoi spre periferie şi eliminate din celulă în zona unde contururile membranei nu mai pot fi clar vizualizate. Existenţa acestui proces variază în funcţie de specie, ţesutul investigat, tipul fixatorului utilizat, vîrsta animalului, intensitatea proliferării fibroblaştilor, condiţiile de observaţie *in vivo* sau *in vitro* etc. Aspectul cel mai des menţionat este acela de microfibrile, alcătuite din aşezarea cap la cap a unor mici vezicule, de dimensiunile macromoleculei de colagen. Aceste microfibrile prezintă un diametru de 40-100Å, fiind lipsite de periodicitate şi avînd tendinţa de aglomerare la periferia citoplasmei [471]. Se susţine că ar reprezenta linia comună de dezvoltare a tuturor structurilor ţesutului conjunctiv, participînd nu numai la formarea fibrilelor şi fibrelor de colagen, ci şi a fibrelor elastice, reticulinice şi a membranelor bazale [673,674]. În lumina acestor afirmaţii, microfibrilele reprezintă „cheia" organizării structurale a ţesutului conjunctiv şi pot fi considerate produsul particular de sinteză al fibroblaştilor. Cercetări ulterioare vor aduce noi precizări în acest domeniu, confirmînd sau infirmînd importanţa considerabilă pe care anumiţi autori o acordă microfibrilelor, punînd capăt disputelor care durează de un secol, privind sediul intra- sau extracelular al fibrilogenezei.

Variabilitatea dimensiunilor şi aspectelor diferitelor formaţiuni intracelulare denumite filamente, microfibrile, fibrile primare, protofibrile etc. demonstrează modalităţile diferite de agregare a macromoleculelor de colagen în funcţie de tipul celulei, solicitarea funcţională, condiţiile metabolice locale etc. Astfel, în tendonul care regenerează, unde există o intensă neoformare de fibre colagene, nu s-au descris acumulări intracelulare de microfibrile sau alte tipuri de structuri fibrilare [321]. În schimb, în fibroblaştii aparent inactivi din capsula unui ganglion nervos s-au evidenţiat fibrile cu diametru de 300-500 Å şi cu periodicitate netă de 580 Å, situate în vecinătatea nucleului [727]. Mai menţionăm că, în cazuri de fibromatoză desmoidă, celulele conţin fibrile cu periodicitate şi structură caracteristică colagenului matur, situate în cisternele dilatate ale reticulului endoplasmic [1176].

Scanned with OKEN Scanner

CONDROBLASTUL

Condroblastul sintetizează matricea cartilajului, care conţine 56,4% colagen, 20,3% mucopolizaharide acide şi 22,8% proteine necolagene [27]. Studii utilizînd variate tipuri de radioizotopi au demonstrat că mucopolizaharidele şi proteinele sînt elaborate simultan de aceeaşi celulă [192]. Ca şi la fibroblaşti, densitatea celulelor, permiţînd variate interacţiuni de la un element la altul, ar constitui un factor esenţial de menţinere şi stimulare a unei capacităţi secretorii, genetic determinate [1]. La o densitate maximă, sinteza pe element celular a fost 260 μmg de colagen şi 20 μmg de condroitin-sulfat [561].

S-a constatat că, pe măsură ce se produce maturarea celulei, se înmulţesc canaliculele reticulului endoplasmic, care suferă un proces de „redistribuţie", reflectat prin apariţia unor şiruri paralele, alternînd cu dilataţii pînă la 0,5 μ diametru. În lumenul canalelor apare un material relativ dens la electroni care poate fi urmărit pe distanţe pînă la 5 μ [826]. În acelaşi timp, creşte numărul şi diametrul veziculelor aparatului Golgi, iar, între suprafeţele netede şi rugoase ale reticulului endoplasmic, apar numeroase interconexiuni. În sfîrşit, se înmulţesc granulele intracitoplasmatice, unele legate de membrane, altele libere. În evoluţia ulterioară spre condrocit, vacuolele au tendinţa de a fuziona în cisterne largi, sugerînd un grad ridicat de specializare funcţională a celulei. Acest vast proces de interconectare a canaliculelor, veziculelor şi formaţiunilor cu dilataţii sacciforme, ar reflecta o dinamică continuă a proceselor de sinteză, agregare şi stocaj ale materialului elaborat [823]. Eliminarea produşilor s-ar face mai ales prin mecanismul pinocitozei inversate,cu descărcarea conţinutului la periferia celulei [1166].

Investigaţii utilizînd prolina marcată au demonstrat că, la 10 — 15 minute de la administrare, radioizotopul apare în cisternele dilatate ale reticulului endoplasmic, iar la 20 — 30 de minute se acumulează în aparatul Golgi, unde apar imagini de agregare în filamente a macromoleculelor de tropocolagen [896]. În culturi de condroblaşti, cînd tensiunea oxigenului este de aproximativ 35%, nu se constată tendinţa macromoleculelor de a agrega în filamente sau fibrile. Dacă însă se măreşte tensiunea oxigenului pînă la 95%, în celulă apar filamente, fibrile şi chiar formaţiuni mature cu periodicitatea de 640 Å [1186]. Aceste observaţii constituie încă un exemplu asupra variabilităţii factorilor care pot influenţa, de la o celulă la alta şi de la o condiţie experimentală la alta, dinamica circuitului intracelular al macromoleculelor de colagen.

OSTEOBLASTUL ŞI CALCIFICAREA COLAGENULUI

Din punct de vedere ultrastructural, cea mai importantă particularitate a osteoblastului este, ca şi la fibroblast şi condroblast, prezenţa unui reticul endoplasmic rugos extrem de dezvoltat. Abundenţa canaliculelor şi sacilor sugerează o intensă capacitate de a sintetiza proteine,

Scanned with OKEN Scanner

legată de formarea matricei în care se vor depune sărurile de calciu. Această matrice conţine peste 90% colagen, numai 0,5% mucopolizaharide, precum şi cantităţi variabile de glicoproteine şi proteine necolagene.

Din punct de vedere metabolic, cea mai importantă particularitate a osteoblastului pare să fie capacitatea de a funcţiona cu un consum extrem de redus de oxigen, necesitînd în schimb mari cantităţi de glucoză. După cum s-a menţionat, o proporţie de 50-80% din glucoza marcată este convertită de aceste celule în acid lactic, apoi în aminoacizi care intră în constituţia colagenului [334].

Cantitatea de colagen sintetizată de osteoblaşti variază pe unitatea de timp şi de volum, în funcţie de tipul osului, vîrsta animalului şi de condiţiile experimentale.

De exemplu, în culturile de osteoblaşti din tibia de embrion de găină, s-au găsit 11 μg de colagen, elaborate în 24 de ore [534]. Din totalul prolinei marcate administrate, aproximativ 10% a fost regăsită în mediul de cultură sub formă de hidroxiprolină. Urmărirea circuitului intracelular al radioizotopului a dus la descrierea aceloraşi imagini de trecere prin reticulul endoplasmic şi aparatul Golgi, ca şi la fibroblaşti şi condroblaşti, urmate de eliminare, mai ales prin mecanismul pinocitozei „inversate".

Dacă se cultivă osteoblaşti şi condroblaşti, ritmul sintezei colagenului nu este similar între cele două tipuri de celule.

Astfel, primele fibrile de colagen apar după 30 de ore de cultură în jurul osteoblaştilor, şi după 48 de ore în jurul condroblaştilor. Aceasta demonstrează că fibrilogeneza este mult mai rapidă în ţesutul osos în comparaţie cu cel cartilaginos. Cantitatea de colagen a fost de 17,2% în mediul de cultură cu osteoblaşti, şi de numai 9,1% în cel cu condroblaşti, ambele determinări fiind efectuate la 48 de ore de la începutul culturilor. În schimb, hexozamina a prezentat valori mai mici în mediul cu osteoblaşti, în comparaţie cu cel de condroblaşti (1,2%, faţă de 4,25%).

Se poate afirma că în condiţiile aceluiaşi mediu de cultură, osteoblaştii produc, pe unitatea de timp, o cantitate mai mare de colagen şi mai redusă de mucopolizaharide, în comparaţie cu condroblaştii [526].

Extracţiile cu colagenază, după administrarea de H_3-glicină şi H_3-prolină au permis să se demonstreze că osteoblaştii sintetizează, concomitent, şi colagen, şi proteine necolagene [194], ambele tipuri de secreţie urmînd acelaşi ciclu intracelular.

S-a descris şi în osteoblaşti existenţa de microfibrile şi de filamente, cu origine şi semnificaţie greu de precizat; s-au prezentat secvenţe care ar sugera o eliminare ritmică a microfibrilelor din celule [1167]. Ajunse în spaţiul extracelular, microfibrilele ar adera la suprafaţa celulei, aglomerîndu-se în special în jurul prelungirilor digitiforme ale citoplasmei, prelungiri care se întind în masa osteoidului, spre frontul de mineralizare. La nivelul pulpei dentare, osteoblaştii ar elabora un material granular ce se dispune paralel cu membrana celulei, alcătuind, la periferia odon-

Scanned with OKEN Scanner

toblastului, fibrile cu diametrul de 70-80 Å; acestea devin cu atît mai groase, cu cît se depărtează de elementul care le-a format [343].

★

Sinteza colagenului în osteoblaşti este legată de un important fenomen biologic: procesul de calcificare a matricei elaborată de respectivele celule.

Deşi asupra procesului de calcificare s-au scris numeroase monografii şi un număr impresionant de lucrări, care au folosit toată metodologia modernă, totuşi, mecanismul intim al acestui proces nu poate fi încă explicat decît prin ipoteze sau speculaţii.

Dintre ipotezele, mai larg acceptate, privind mecanismul mineralizării oaselor, menţionăm:

a) Capacitatea osteoblaştilor de a sintetiza o fosfokinază, care ar transfera grupe fosfat macromoleculelor de colagen [388]. Incubaţii *in vitro* au demonstrat că fiecare macromoleculă de colagen poate capta 1 mol de fosfat dintr-o soluţie de ortofosfat [747]. Acest fosfat, legat covalent, poate constitui nucleul de precipitare a cristalelor de hidroxiapatită pe suprafaţa fibrilelor de colagen. Precipitarea ar fi determinată de procese de epitaxie, respectiv de formarea şi creşterea unui cristal mineral pe un suport organic, cu o textură spaţială similară. Acest proces ar fi important în special pentru înţelegerea mecanismului mineralizării dinţilor [1095]. În sprijinul acestei afirmaţii pledează constatarea că în dinte există 0,4% rezidii fosfat, în comparaţie cu numai 0,006% în oasele lungi. În afara rolului de factor de nucleere a cristalelor anorganice, se mai atribuie grupelor fosfat şi capacitatea de a face legături intermoleculare, mărind astfel stabilitatea structurală a fibrelor de colagen. Aşa s-ar explica de ce colagenul din dinte este mai puţin solubil, în comparaţie cu cel din alte teritorii conjunctive [1093].

b) Absenţa, în paternul metabolic al osteoblaştilor, a sintetizării unor factori ce inhibă mineralizarea şi care sînt prezenţi în produşii elaboraţi de fibroblaştii din tendon, de condroblaştii din cartilaj etc. În cartilajul nazal de bou, de exemplu, s-a izolat un complex polizaharid-proteină, denumit P-Pl 5 care inhibă, *in vitro*, mineralizarea cartilajului; se găseşte în concentraţie de 0,107 g pe g de cartilaj uscat, această cantitate dovedindu-se eficientă pentru a preveni depunerea în matricea cartilajului a 0,072 g de săruri de calciu [278]. Un alt mecanism de inhibare ar fi reprezentat de modul în care celula modifică concentraţia locală de pirofosfat [335]. Se sugerează că 1 mol de pirofosfat ar fi legat de 2 grupe amino aparţinînd lizinei şi hidroxilizinei colagenului şi, sub această formă, s-ar opune precipitării hidroxiapatitei. Dacă însă osteoblastul elaborează un factor de eliminare a pirofosfatului, mineralizarea se produce.

c) Rolul mucopolizaharidelor acide, sintetizate de osteoblast o dată cu colagenul, este variat interpretat de diferiţi autori. S-a sugerat că, în special grupele sulfat ale condroitin-sulfaţilor, prin dispoziţia lor la intervale regulat spaţiate, ar putea constitui centre de reţinere a calciului, cu favorizarea

nucleerii. Existența unui paralelism între concentrația de grupe sulfat și intensitatea mineralizării, ar pleda pentru această ipoteză [1021]. Concentrarea de grupe sulfat este însă un proces tranzitoriu, avînd doar rolul de nucleu de condensare care împiedică difuzarea liniară a electroliților. După ce s-au format primele cristale de hidroxiapatită, osteoblastul elimină enzime desulfatante, grupele sulfat sînt degradate, iar ionii de calciu se leagă covalent de macromoleculele de colagen.

d) Participarea unor glicoproteine, sintetizate tot de osteoblaști, este sugerată de anumite analize biochimice. În lumina acestor rezultate, ionii de calciu ar fi legați de grupele acide ale mucopolizaharidelor, așa cum s-a afirmat mai sus, în timp ce ionii fosfat sînt captați de glucidele din glicoproteine [113]. După eliminarea grupelor sulfat, ionii de calciu rămași liberi sînt legați de ionii fosfat și precipitarea hidroxiapatitei are loc la nivelul glicoproteinelor, ce joacă rolul de ciment interfibrilar.

În cursul vindecării fracturilor experimentale s-a constatat o considerabilă dezvoltare a reticulului endoplasmic și a aparatului Golgi în osteoblaștii din jurul fracturii, urmată de acumulare pericelulară de fibrile de colagen. Anumite analize biochimice susțin că paternul aminoacizilor din acest colagen este deosebit, cantitativ, de cel din zonele de mineralizare fiziologică, în sensul elaborării unei macromolecule cu zone apolare mai reduse și zone polare mai întinse. Cantitatea mai mică de iminoacizi ar explica și gradul mai redus de stabilitate structurală a fibrelor [761].

★

Încercînd să sintetizăm procesul de biogeneză a colagenului, corelat cu organitele celulare unde au loc diferitele etape ale acestui proces, prezentăm următoarea schemă:

Protoplasmă: prolină + ATP → prolil AMP (ARN solubil) → prolil ARN solubil (din care aproximativ 70% este utilizat pentru sinteza proteinelor necolagene și 30% pentru sinteza colagenului).

Ribozomi: subunități ale lanțurilor polipeptidice, conținînd prolină în secvența gli — pro — X.

Polizomi: asamblarea subunităților în lanțuri polipeptidice de tip $alfa_1$ și $alfa_2$, cu hidroxilarea concomitentă a prolinei în hidroxiprolină și a lizinei în hidroxilizină. Apariția dispoziției helicoidale a lanțurilor. Unirea a două lanțuri de tip $alfa_1$ și a unui lanț de tip $alfa_2$ spre a da naștere macromoleculei de tropocolagen, cu aspect de triplu helix.

Reticul endoplasmic: eliminarea în lumenul canaliculelor și al sacilor a macromoleculelor de colagen, o parte a acestor macromolecule putînd ajunge, prin intermediul acestor canalicule, în spațiile extracelulare.

Aparatul Golgi: stocarea macromoleculelor de tropocolagen, formarea primelor filamente din agregarea cap la cap a unităților macromoleculare. Posibilă, conectarea unităților glucidice ce formează legături transversale între macromolecule și lanțurile polipeptidice. Eliminarea colagenului stocat în vezicule, sub aspectul pinocitozei inversate.

Scanned with OKEN Scanner

Membrana celulară : agregarea macromoleculelor la suprafaţa membranei sub formă de filamente şi fibrile. Dispariţia materialului lipoproteic în zonele unde se elimină filamente şi fibrile din protoplasmă spre exteriorul celulei.

Spaţiul extracelular : agregarea filamentelor în fibrile şi a fibrilelor în fibre. Conectarea de mucopolizaharide acide, glicoproteine şi proteine necolagene, ca ciment interfibrilar.

DEGRADARE

Degradarea colagenului a fost evidenţiată în următoarele procese fiziologice şi patologice [1188] :

I. **În condiţii fiziologice.** *a*) Turnoverul metabolic normal al macromoleculei de colagen. *b*) Dezvoltarea intra- şi extrauterină, îmbătrînirea, remodelarea continuă a organelor şi ţesuturilor; procesele de creştere şi de involuţie, legate de înaintarea în vîrstă. *c*) Creşterea şi remodelarea osului; rezorbţia osului şi a cartilajului; rezorbţia în culturi de ţesuturi; erupţia dinţilor, rezorbţia dinţilor şi a fibrelor periodontale. *d*) Rezorbţia colagenului legată de reproducere : involuţia post partum a corpului şi a colului uterin; remodelarea uterului gravidic; reacţia deciduală; nidarea oului; modificările endometrului în cursul ciclului ovarian; involuţia uterului după ovariectomie; relaxarea simfizei pubiene şi a colului uterin; maturarea şi ruperea foliculilor ovarieni; rezorbţia membranei Reichert; involuţia glandei mamare.

II. **În condiţii patologice.** *a*) Osteopatii : osteoporoza senilă; osteoporoza prin imobilizare; boala Paget; sindromul Fanconi; rachitismul; osteomalacia; hipertiroidismul; hiperparatiroidismul; tumorile cu metastaze osoase; boli ce se însoţesc de osteoliză; paradentozele. *b*) Boli ale ţesutului conjunctiv şi ale pielei : osteoartrite; artrita reumatoidă; sindromul Sjögren; pericondrita condrolitică; sclerodermia; elastoza actinică; epiteliomul bazocelular; keloidul; atrofiile dermice. *c*) Scorbutul. *d*) Varia : tumori cu caracter invaziv sau regresiv; latirismul; distiroidiile; sindromul Marfan; ulcerele; boala Cushing.

III. **În condiţii experimentale.** *a*) Procesul de cicatrizare; leziunile pielei şi plăgile subcutanate; arsurile; fracturile. *b*) Rezorbţia colagenului implantat; catgut, fire de colagen, bureţi de colagen, grefe de tendoane, piele, vase etc. *c*) Introducerea de material străin în organism : carageenină, polivinil, siliciu etc. *d*) Substanţe chimice ce determină liza colagenului : ulei de croton, alcaline etc. *e*) Ciroza experimentală.

În contrast cu concepţia clasică ce considera colagenul un material inert din punct de vedere metabolic, sintetizat o dată pentru totdeauna, cercetările moderne au demonstrat continua elaborare şi degradare a

Scanned with OKEN Scanner

colagenului în toate organele şi ţesuturile. Utilizîndu-se ca trasori glicina, prolina, hidroxiprolina, lizina şi hidroxilizina s-a demonstrat că timpul de înjumătăţire variază în limite foarte largi, de la cîteva ore, pentru fracţiile recent elaborate, pînă la cîteva sute de zile, pentru macromoleculele incluse în fibre. La şobolan, animalul cel mai utilizat pentru astfel de studii, turnoverul colagenului variază între 3—480 de zile în os, 17—300 de zile în piele, 20—76 de zile în tendon, fiind de 14 zile în intestin, 35 de zile în muşchi, 210 zile în rinichi, 21 de zile în ficatul normal şi 160 de zile în cel cirotic, 12 zile în uterul normal şi numai 1—2 zile în cel în involuţie post partum.

Intensificarea catabolizării colagenului se reflectă prin creşterea valorilor urinare ale hidroxiprolinei, indicînd degradarea macromoleculei în peptide şi aminoacizi dializabili. Astfel, din datele prezentate în variate lucrări, menţionăm că, acceptînd ca normală cantitatea de 27 mg hidroxiprolină eliminată în 24 de ore de un adult, se pot întîlni următoarele creşteri : 550 mg în arsuri, 300 mg în rachitism, 253 mg în boala Paget, 192 mg în sindromul Fanconi, 183 mg în osteomielite, 180 mg în displazia fibroasă, 120 mg în fracturi, 93 mg în hipertiroidism, 90 mg în osteopatii asociate cu întîrzieri mintale, 86 mg în metastaze osoase, 69 mg în hiperparatiroidism, 65 mg în sclerodermie, 58 mg în acromegalie etc.

Importanţa deosebită pe care o are degradarea colagenului în organismul normal şi patologic, contrastează cu rezultatele modeste de care dispunem pînă acum spre a explica mecanismele prin care se efectuează degradarea şi spre a încerca să le dirijăm în scop terapeutic.

Cu un deceniu în urmă, se credea în existenţa unei singure enzime capabilă să degradeze colagenul nativ, în condiţii fiziologice de pH şi temperatură : colageneza bacteriană, izolată din variatele tulpini de *Clostridium*[698]. Ulterior, s-a sugerat şi s-a încercat să se demonstreze că în procesul de catabolizare ar interveni şi proteaze nespecifice (catepsine, tripsină, chimotripsină etc.). Aceşti fermenţi ar fi inactivi asupra colagenului nativ, dar ar deveni eficienţi cînd macromolecula este în prealabil alterată. Investigaţii *in vitro* au dovedit că, dacă se denaturează colagenul prin creşteri mari ale temperaturii, prin scăderi importante ale pH-ului sau prin adăugarea de substanţe în concentraţii nefiziologice, fibrele devin susceptibile şi la proteazele nespecifice. Deşi foarte convingătoare *in vitro*, aceste rezultate nu se pot suprapune cu condiţiile existente *in vivo*, unde nu apar creşteri de temperatură sau scăderi de pH, comparabile cu cele din modelele experimentale. S-a ajuns astfel la concluzia că trebuie căutat şi la animale un sistem colagenolitic specific, cu acţiune superpozabilă colagenazei bacteriene. De altfel, existenţa acestui sistem a fost frecvent sugerată prin fapte de observaţie ca : rapida involuţie post partum a uterului uman, ducînd, la degradarea, în 72 de ore, a peste 50% din cantitatea totală de colagen ce a preexistat naşterii ; dispariţia matricei osoase şi cartilaginoase din simfiza pubiană înainte de eliminarea fătului ; relaxarea colului uterin ; „fuga" colagenului, la bătrîni, din rezervoarele sale naturale (os, cartilaj şi derm), constituind cauza apariţiei

Scanned with OKEN Scanner

osteoporozelor şi a pielii senile. Nu putem afirma că există, pînă acum dovezi convingătoare asupra creşterii concentraţiei colagenazelor în ţesuturile cu un intens catabolism al fibrelor de colagen, cu excepţia datelor obţinute în culturile de ţesut osos. Aceste rezultate neconcludente au sugerat ipoteza că enzima ar exista blocată de inhibitori tisulari (unul dintre aceştia fiind substratul însăşi) şi că anumite condiţii, fiziologice sau patologice, ar debloca fermentul. În sprijinul acestei ipoteze ar pleda observaţia că degradarea masivă a colagenului în uterul post partum începe o dată su scăderea bruscă a pragului foliculinei şi este inhibată dacă se administrează estrogeni, menţinîndu-se pragul lor ridicat din timpul sarcinii. De asemenea, osteoporozele şi osteoartrozele ce apar în timpul menopauzei, o dată cu reducerea pragului foliculinei în sînge şi ţesuturi, ar putea fi determinate tot de o activare a unor colagenaze ce catabolizează intens fibrele conjunctive din matricea osoasă şi a cartilajului articular. Toate acestea nu sînt însă, la ora actuală, decît simple speculaţii şi trebuiesc primite cu rezerva cuvenită. Ar mai fi de menţionat observaţia că aşa-zisele colagenaze tisulare nu s-au dovedit capabile să atace şi să degradeze fibrele de colagen din ţesuturi, ci colagenul solubil sau fibrilele reconstituite, *in vitro*, din soluţii de colagen. Din punct de vedere teoretic, activitatea colagenazelor tisulare pare insuficientă pentru a cataboliza fibrele, întrucît ele ar cliva numai 3 din cele peste 1 000 de legături existente în macromolecula de colagen. De aceea s-a sugerat că aceste colagenaze doar ar „iniţia" degradarea colagenului, favorizînd apariţia unor produşi cu greutate moleculară încă ridicată, dar mai uşor de denaturat şi mai accesibili catalizei exercitate de proteazele nespecifice.

Pe de altă parte, trebuie subliniat că degradarea colagenului nu înseamnă numai hidroliză enzimatică specifică sau nespecifică. În ultimul capitol al monografiei arătăm că razele X, ca şi cele ultraviolete produc dispersia şi solubilizarea fibrelor de colagen, în special la nivelul dermului, fără nici o intervenţie a unui factor enzimatic. În sprijinul acestei afirmaţii pledează constatarea că aceste fibre pot fi degradate şi *in vitro*, în soluţii conţinînd numai ser fiziologic. În sensul catabolizării mai active a fibrelor de colagen acţionează şi anumiţi hormoni, vitamine şi agenţi terapeutici.

Întucît mecanismele ce nu implică participarea enzimelor la degradarea colagenului vor fi semnalate în capitolele II şi IV, în rîndurile care urmează vom prezenta numai activităţile enzimatice care intervin în catabolismul macromoleculei de colagen.

Colagenazele (E.C. 3.4.4.19.)

COLAGENAZELE BACTERIENE

Culturile de *Clostridium histolyticum* şi *perfrigens* (tip A) au realizat cele mai favorabile condiţii de izolare şi purificare a enzimei. Accidental s-au mai evidenţiat colagenaze în culturile de *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Proteus vulgaris* etc.

Scanned with OKEN Scanner

Particularitatea catalizei exercitate de colagenaza bacteriană este clivarea unei legături peptidice dintre un aminoacid oarecare şi glicină, în secvenţa P — R — R' — P, P fiind prolina sau hidroxiprolina, R un aminoacid variabil (mai frecvent alanina) şi R', glicina. Întucît această secvenţă este caracteristică regiunilor apolare, cristaline, ale macromoleculei de colagen, rezultă că enzima clivează zonele bogate în glicină şi iminoacizi. Faptul că din aceste degradări rezultă tripeptidele, sugerează că fermentul este capabil să desfacă fiecare a 3-a legătură peptidică, existentă în zonele apolare ale macromoleculei.

Specificitatea colagenazei bacteriene de a degrada lanţuri polipeptidice avînd o anumită secvenţă a aminoacizilor a fost testată şi pe substraturi sintetice, fiind utilizat în acest sens în special un hexapeptid, incluzînd Z — glicină — prolină — glicină — glicină — prolină — alanină — — OH (Z = benziloxicarbonil). Enzima degradează acest hexapeptid în : Z — gli — pro — gli şi gli — pro — ala, desfăcînd legătura dintre glicină şi glicină[417]. Un alt substrat sintetic utilizat conţine Pz — prolină — — leucină — glicină — prolină — D — arginină — OH (Pz = p-fenilazobenziloxicarbonil) şi este clivat în felul următor [1202] :

Pz — prolină — leucină — glicină — prolină — D — arginină — OH
1 2 3 4 5

↓ *colagenază bacteriană*

Pz — pro — leu — OH + H_2N — gli — pro — D — arg — OH.

Deci atît pe colagenul nativ, cît şi pe substrate sintetice, enzima pe care o denumim colagenază bacteriană clivează o legătură peptidică dintre un anumit aminoacid şi glicină, necesitînd prezenţa unui iminoacid (prolină sau hidroxiprolină) în poziţie anterioară aminoacidului ce se leagă de glicină. Această particularitate catalitică, ca şi faptul că acest ferment nu hidrolizează proteine globulare sau alte tipuri de scleroproteine, permite să se vorbească de o înaltă specificitate de acţiune.

Colagenaza bacteriană are o greutate moleculară de 109 000 [983] şi un punct izoelectric situat în vecinătatea pH-ului 9 [699]. Atacul ei asupra colagenului nativ sau al gelatinei, duce la apariţia unui amestec de tripeptide şi peptide mai mari, primele reprezentînd zonele apolare, ultimele zonele polare ale macromoleculei. Tripeptidele sînt frecvent formate din secvenţa glicină-iminoacizi, iar peptidele mai mari includ secvenţa :

G — P — A (G — B — C — G — D — E) — P — X

în care ABDCE reprezintă alţi aminoacizi decît glicina, G, glicina, iar P, iminoacizii prolină sau hidroxiprolină. Aceşti produşi de degradare au o greutate moleculară de 400—500 [1206]. Cea mai mare parte a aminoacizilor eliberaţi reintră în poolul metabolic, excepţie făcînd în special hidroxiprolina şi hidroxilizina, care sînt fie distruse, fie eliminate prin urină. Intensitatea degradării este influenţată de suprafaţa fibrelor care vin în contact cu enzima, de bogăţia legăturilor intermoleculare preexistente

Scanned with OKEN Scanner

şi de substanţele prezente în soluţie şi care pot acţiona ca stimulatori sau inhibitori. În acest sens, menţionăm că ionii metalici (în special calciul) măresc susceptibilitatea substratului la colagenază.

Precipitarea cu sulfat de cupru, fracţionarea ulterioră pe Sephadex, electroforeza, cromatografia pe DEAE-celuloză etc. au permis separarea, din complexul denumit colagenază, a două fracţii enzimatice. Ele diferă prin paternul aminoacizilor, structura moleculei, proprietăţile enzimatice şi modul de a hidroliza colagenul. Este dificil de precizat dacă ne aflăm în prezenţa unor izoenzime sau a variate forme structurale ale unei enzime primare. Din datele acumulate pînă acum rezultă că fracţia I are un pH optim spre alcalin, iar fracţia a II-a spre acid. Peptidele sintetice sînt diferit degradate de către cele două fracţii, fracţia a II-a fiind chiar inactivă pe hexapeptidul Z — gli — pro — gli — gli — pro — ala [950], în schimb, asupra colagenului nativ ar apare aceiaşi rată de hidroliză. S-a mai susţinut că fracţia I ar acţiona în special prin ruperea legăturilor peptidice, în timp ce fracţia a II-a ar modifica dispoziţia sterică a lanţurilor peptidice. Ipoteza că cele două componente au un efect adiţional este susţinută de constatarea că 0,5 ml din fracţia I şi 0,5 ml din fracţia a II-a catalizează mai eficient colagenul nativ, decît 1 ml numai din fracţia I sau 1 ml numai din fracţia a II-a [701].

COLAGENAZELE ANIMALE

Cea mai elocventă demonstraţie a existenţei colagenazelor animale a fost făcută cu ajutorul culturilor provenind din pielea dorsală şi coada mormolocului de broască [431]. În mediul de cultură a putut fi izolată o enzimă ce atacă colagenul nativ la pH şi temperatură fiziologică. Pusă să acţioneze asupra pielii de embrion de şobolan, ea produce o scindare a macromoleculei în două fragmente, unul cuprinzînd 2/3, altul 1/3 din volumul respectivei macromolecule. În ambele fragmente, configuraţia triplului helix este menţinută după hidroliza enzimatică. Greutatea moleculară a celor două fragmente este de 71 000 şi respectiv, 24 000; ambele conţin resturi din 3 lanţuri peptidice: două de tip alfa$_1$ şi unul de tip alfa$_2$. Aceste rezultate demonstrează că prin degradarea macromoleculei de colagen se rup toate cele trei lanţuri alfa, în proporţie egală. Fragmentul mai mare ce rezultă din această hidroliză are, la C terminal, glicina, iar fragmentul mai mic, leucina sau izoleucina.

Spre deosebire de colagenaza bacteriană, care clivează cu predilecţie legătura peptidică dintre un aminoacid X şi glicină, colagenaza animală rupe legătura peptidică dintre leucină sau izoleucină şi glicină. În rest, ambele tipuri de enzime sînt active la acelaşi pH neutru, fiind inhibate atît de absenţa ionilor bivalenţi (mai ales a celor de calciu), cît şi de prezenţa funcţiilor — SH.

Colagenaza pancreatică a fost demonstrată indirect, prin capacitatea sucului pancreatic de a solubiliza colagenul precipitat din fibrele tendonului Achile [1221]. Ulterior s-a susţinut că această enzimă ar ataca doar complexele mucoprotidice care cimentează fibrele între ele, lăsînd intacte macro-

Scanned with OKEN Scanner

moleculele de colagen [65], [69]. Extractele alcaline de pancreas total s-au dovedit însă capabile de a trece în stare de produşi dializabili aproximativ ½ din hidroxiprolina colagenului nativ solubil [504], [505]. De asemenea, acelaşi extract elimină cantităţi mai mici de hidroxiprolină şi din fracţia insolubilă a colagenului; nu hidrolizează proteinele globulare sau hemoglobina.

Colagenaza sau colagenazele izolate din granulocitele neutrofile sînt de o deosebită importanţă pentru explicarea mecanismului de degradare a fibrelor de colagen în focarele inflamatorii. Fermentul s-ar găsi concentrat în granule; omogenatul de leucocite totale sau cel numai de granule eliberează aceiaşi cantitate de hidroxiprolină din colagen (aproximativ 21%), în timp ce, extractul de limfocite sau tripsina au o acţiune de 4 ori mai mică (aproximativ 5,5% şi 5,0%). Activitatea enzimatică pare maximă la pH fiziologic, fiind inhibată de EDTA şi cisteină, şi diminuată de prezenţa glutationului [635].Fermentul clivează macromolecula în două fragmente, asemănătoare celor obţinute sub acţiunea colagenazei de la mormolocul de broască. Clivarea are loc la aproximativ 1/4 distanţă de la capătul terminal al respectivei macromolecule, iar produşii ce rezultă par să fie, ulterior, degradaţi de proteazele nespecifice, prezente, de asemenea, în lizozomii granulocitelor neutrofile [636].

S-au mai evidenţiat activităţi colagenazice în celulele osului, ficatului uterului, pielii, sinovialei, în gingia inflamată, în ficatul cirotic, în variate granuloame prin substanţe iritante sau corpi străini etc. Cele mai multe dintre aceste enzime acţionează similar cu cea descrisă la mormolocul de broască, clivînd macromolecula de colagen în două fragmente inegale, cu păstrarea în fiecare fragment a dispoziţiei în helix trispiralat. De asemenea, s-au constatat activităţi de tipul colagenazei în celulele HeLa, în fibroblaşti şi în numeroase alte celule ale embrionului de găină. În culturi de ţesuturi de fibroblaşti apare, în mod caracteristic, o creştere a sintezei de colagen şi o scădere a activităţii colagenazei în faza logaritmică, în timp ce, în faza staţionară, biosinteza este redusă şi cataliza enzimatică activată. Adăugarea de acid ascorbic la mediul de cultură stimulează sinteza colagenului şi inhibă degradarea prin colagenază [1041]. Din ficatul cirotic de om s-a izolat o colagenază care poate degrada acelaşi substrat sintetic, alcătuit dintr-un pentapeptid pe care îl clivează specific şi colagenaza bacteriană [929]. În sfîrşit, mai menţionăm că enzime cu acţiune colagenazică, active la pH neutru, au fost evidenţiate şi în unele tumori maligne, aducîndu-se astfel o contribuţie la înţelegerea mecanismului prin care aceste tumori invadează şi disemineză, distrugînd fibrele conjunctive din jurul lor [909].

Cu toată această bogăţie de date, foarte sumar prezentate, este încă îndoielnic dacă organismul animal posedă colagenaze adevărate (cu acţiune specifică similară colagenazelor bacteriene) sau numai un anumit tip de enzime, capabile să producă doar o degradare parţială a macromoleculei de colagen, suficientă însă pentru a o face susceptibilă la hidro-

Scanned with OKEN Scanner

liza ulterioară prin proteaze nespecifice, abundente în toate țesuturile și organele. Observații efectuate pe variate granuloame experimentale ar pleda pentru această ultimă ipoteză [90].

Proteazele nespecifice

Modul de acțiune al proteazelor nespecifice s-ar caracteriza prin degradarea telopeptidelor ce alcătuiesc micile ramificații polare, situate la capătul terminal al macromoleculei de colagen. Ca rezultat al acestei degradări, cele trei lanțuri polipeptidice dispuse în triplu helix nu sînt afectate, în schimb sînt amputate lanțurile laterale care participă, prin interconectarea lor, la polimerizarea macromoleculei de colagen sub formă de fibrile. De aceea, colagenul în soluție, supus acțiunii enzimelor proteolitice, agregă mult mai greu spre a forma fibrile, decît cel netratat. Prin acest proces ar rezulta fie macromolecule dializabile, fie produși ce vor fi fagocitați și degradați, în continuare, în lizozomii celulelor. Dintre proteazele nespecifice utilizate pentru studiul degradării colagenului menționăm :

TRIPSINA

Tripsina nu are acțiune catalitică asupra colagenului în stare nativă, ci numai asupra celui denaturat. Totuși, după digestia cu tripsină, colagenul nativ devine mai susceptibil la colagenază ceea ce ar sugera că sînt desfăcute anumite legături intermoleculare care înlesnesc contactul ulterior între substrat și enzima specifică. Aceste legături par a fi situate la capetele terminale ale macromoleculei, în regiunea polară, bogată în telopeptide anexate triplului helix. Analiza modului de acțiune a enzimei a sugerat că ea clivează legătura peptidică dintre aminoacizii bazici (arginină și lizină, prin gruparea lor carboxil) și glicină (prin gruparea amină). În schimb, conexiunile dintre aminoacizii bazici și iminoacizi nu sînt atacate de tripsină. Drept urmare, ea desface numai aproximativ 60 % din legăturile care implică participarea grupării carboxil a aminoacizilor bazici [428]. După desfacerea acestor conexiuni, sînt eliminate mici lanțuri peptidice, frecvent bogate în tirozină, apărînd două modificări fizico-chimice : 1) se reduce considerabil capacitatea de agregare fibrilară a macromoleculelor de colagen [965]; 2) se reduce vîscozitatea specifică a soluțiilor de tropocolagen [502].

PEPSINA

Modul de acțiune este asemănător cu cel al tripsinei, pepsina clivînd telopeptidele de la capetele terminale ale macromoleculei de co-

Scanned with OKEN Scanner

lagen, cu apariţia, în mediul de extracţie, a rezidiilor bogate în tirozină. Întrucît s-a constatat că scăderea cantităţii de tirozină din colagen ar fi paralelă cu diminuarea capacităţii de agregare fibrilară a macromoleculelor, s-a sugerat că peptidele conţinînd tirozină joacă un rol important în formarea fibrilelor. Această supoziţie este întărită şi de constatarea că, după digestie cu pepsină, creşte raportul dintre componentele peptidice alfa şi beta ale triplului helix, indicînd desfacerea legăturilor dintre lanţurile alfa, o dată cu dispariţia telopeptidelor. În lumina acestor date, o importanţă din ce în ce mai mare capătă aşa-zisa porţiune „necolagenică" a macromoleculei de colagen. Rezultatele acumulate pînă acum în acest domeniu nu sînt încă destul de concludente spre a insista mai mult asupra lor. Menţionăm că pepsina clivează în special legătura adiacentă acizilor aspartic sau glutamic, acţionînd, în comparaţie cu tripsina, la alt nivel al micului lanţ telopeptidic [104].

CATEPSINELE

Aceste enzime constituie, după colagenaze, subiectul cel mai mult discutat privind degradarea colagenului.

Sub denumirea de catepsine se descriu numeroase peptidaze (aminopeptidaze, carboxipeptidaze, di- şi tripeptidaze, leucilaminopeptidaze, prolidaze, prolinaze etc.) existente în lizozomii celulelor şi implicate în procesele de autofagie. Cataliza lor necesită, *in vitro*, un pH între 3 şi 4 [1191], rar întîlnit *in vivo*. De aceea, problema implicării lor în degradarea colagenului la un pH neutru, aşa cum există în uterul în involuţie post partum, este mult discutată. S-a sugerat că activitatea acestui complex enzimatic ar fi modelată de anumite substanţe (în special de natură hormonală), capabile să se combine cu centrul activ al fermentului şi să modifice pH-ul spre neutralitate; nu avem însă dovezi concludente în susţinerea acestei ipoteze. Sursele cele mai bogate în catepsine ar fi rinichiul, splina, ficatul şi plămînii. Enzimele cresc considerabil în uter în cursul involuţiei post partum, precum şi în variate faze ale evoluţiei granuloamelor inflamatoare.

Anumiţi autori consideră catepsinele un grup de proteaze nespecializate, prezente în ţesuturi, acţionînd cu eficienţă maximă la un pH în jur de 4. Alţi autori încearcă să atribuie acestui grup o anumită specializare funcţională, evidentă mai ales din studiul degradării substratelor sintetice. Astfel, s-a putut identifica o catepsină care hidrolizează *in vitro*, la pH 5, un substrat avînd secvenţa carbobenzoxi-L-glutamil-L-tirozil; o altă catepsină s-a dovedit capabilă să degradeze, tot la pH 5, un substrat alcătuit din secvenţa benzoil-L-arginilamidă (substrat care este degradat în mod specific şi de tripsina pancreatică); aceiaşi catepsină poate transforma tripsinogenul în tripsină, avînd astfel toate atributele unei tripsine tisulare. Însfîrşit, o a treia catepsină a digerat substratul sintetic glicil-L-tirozilamidă, considerat specific pentru iden-

Scanned with OKEN Scanner

tificarea chimotripsinei. Aceste date sugerează că fermenţii din grupul catepsinelor ar acţiona tot asupra zonelor polare ale macromoleculei de colagen, eliberînd telopeptidele şi depolimerizînd macromoleculele agregate în fibrile. Ele ar îndeplini astfel, *in vivo*, aceleaşi acţiuni catalitice efectuate de tripsină sau chimotripsină *in vitro*. Rămîne însă neclară problema pH-ului, sugerîndu-se că, prin alipirea fibroblaştilor de fibre, s-ar creia mici spaţii închise în care eliberarea de H-ioni ar creia un pH coborît, necesar activităţii catepsinelor.

PRONAZA

Pronaza reduce macromolecula de colagen cu aproximativ 150 Å (5 % din volumul total); macromolecula astfel amputată devine mai susceptibilă digestiei cu proteaze nespecifice. În afara eliberării telopeptidelor, s-au notat şi atacuri asupra zonei cristaline, eliberîndu-se tripeptide cu secvenţa caracteristică gli-pro-hipro [176], [1036]. Enzima este cu atît mai activă, cu cît colagenul respectiv conţine o cantitate mai mică de hidroxiprolină.

Elastină

Tipul particular de organizare macromoleculară a acestui biopolimer îi conferă proprietatea de *elasticitate* de entropie (tip cauciuc), caracterizată printr-o extensibilitate cu spectru larg, realizată cu pierdere redusă de energie calorică şi urmată, după încetarea *stress*-ului mecanic, de revenirea fibrei la dimensiunile iniţiale. Această proprietate specială pe care o prezintă, un mic număr de polimeri, asigură funcţionalitatea structurilor alcătuite din elastină, în teritorii deosebit de importante pentru economia organismului. Pe primul plan menţionăm zonele supuse la *stress*-uri ritmice sau periodice, cum ar fi pereţii arterelor, parenchimul pulmonar, pleura, pericardul, ţesutul conjunctiv dermic, ligamentele etc. În aceste teritorii, concentraţia elastinei atinge valori remarcabile, apreciate de exemplu, pentru pereţii arterelor mari la aproximativ 45 g pentru 100 g de ţesut uscat, iar pentru *ligamentum nuchae* la 70 g pentru 100 g de ţesut uscat.

Cunoaşterea planului de organizare, la nivel molecular, macromolecular şi de complex macromolecular, a structurilor cu proprietăţi elastice, prezintă un interes deosebit în medicină. Este suficient numai să menţionăm că alterări în acest plan de organizare sînt implicate în mecanismele patogenice ale aterosclerozei şi emfizemului pulmonar, boli cu largă răspîndire în masă. De asemenea, aceste alterări au ridicat importante probleme de etiopatogenie în unele boli ereditare, ca sindromul Ehler-Danlos, sindromul Marfan etc.

STRUCTURĂ

Analizarea şi caracterizarea componentelor protidice, glucidice şi lipidice ce alcătuiesc complexul macromolecular pe care îl denumim elastină a prezentat şi prezintă încă numeroase dificultăţi, datorită greutăţii de izolare şi de purificare. În ţesutul conjunctiv acest complex se găseşte strîns intricat biochimic, morfologic şi funcţional cu substanţa fundamentală, cu reticulina, cu membranele bazale şi cu colagenul.

Din aceste motive investigaţiile efectuate asupra elastinei nu au ajuns încă la un stadiu mulţumitor de corelare a datelor de biochimie şi chimie fizicală, cu cele de microscopie fotonică şi electronică.

Scanned with OKEN Scanner

Analiza componentei proteice

Cercetările în acest domeniu au evidenţiat, în linii generale, o similitudine a compoziţiei în aminoacizi a diverselor preparate analizate. Existenţa unui conţinut de 15 — 16% azot [626] a fundamentat ipoteza că elastina este, în primul rînd, o proteină. Compoziţia în aminoacizi, prezentată în tabelul IV, se caracterizează prin cantităţi importante de glicină, alanină valină şi prolină, glicina constituind aproximativ 1/3 din totalul aminoacizilor. Se remarcă, de asemenea, concentraţia mare de aminoacizi apolari (care, în unele eşantioane, reprezintă aproximativ 75% din totalul rezidiilor de aminoacizi [829]), precum şi valorile reduse ale concentraţiei de aminoacizi polari. Cantităţile de hidroxiprolină sînt mici (1 — 2%), deosebind astfel elastina de colagen; subliniem, de asemenea, cantităţile reduse de tirozină şi triptofan şi absenţa aminoacizilor sulfuraţi de tip cistină şi cisteină.

Analizele efectuate asupra compoziţiei elastinei în aminoacizi au permis evidenţierea unor substanţe necunoscute din studiul altor polimeri. Ele au fost denumite iniţial „compus A" şi „compus M", iar ulterior,

Tabelul IV

Analiza aminoacizilor din variate preparate de elastină umană (grame de aminoacizi la 100 grame proteine)

AMINOACIZI	*Valori medii pentru diferite surse* [65]	*Derm* [1012]	*Aortă* [398]	*Plămîni* [330]
Glicină	25	28,85	19,20	23,8
Alanină	22	25,10	20,00	21,5
Valină	16	17,43	15,70	15,8
Prolină	13	15,02	10,00	14,3
Leucină	8	8,57	8,80	8,2
Izoleucină	4	4,04	3,70	3,4
Hidroxiprolină	2	1,66	1,35	2,1
Fenilalanină	6	4,06	4,50	4,0
Treonină	1	1,65	2,50	1,3
Triptofan	urme	—	—	—
Tirozină	2	4,55	3,20	4,1
Serină	1	1,53	2,00	0,9
Acid aspartic	1	0,61	2,10	1,1
Acid glutamic	3	3,39	4,40	3,6
Lizină	1	1,20	1,70	1,3
Histidină	urme	—	0,40	0,3
Arginină	1	1,01	1,60	1,7

desmozină şi izodesmozină. Aceşti doi aminoacizi particulari ai elastinei sînt izomeri structurali, cu greutate moleculară de 524 şi, respectiv, 555, conţinînd un inel piridinic tetra-substituit în poziţiile 1.3.4.5 şi 1.2.3.5 [1070]. Fiecare catenă laterală are un grup carboxil terminal şi un grup alfa-amino

Scanned with OKEN Scanner

terminal, apte să participe la formarea de legături între lanţuri polipeptidice alăturate. Constituţia lor chimică (*fig. 19*) pledează în favoarea ipotezei că aceşti aminoacizi ar deriva din condensarea a 4 molecule de lizină [743, 833]. Fiind constant evidenţiaţi în toate preparatele de elastină analizate, se consideră că prezenţa lor marchează prezenţa elastinei, după cum hidroxiprolina serveşte drept criteriu de identificare a colagenului.

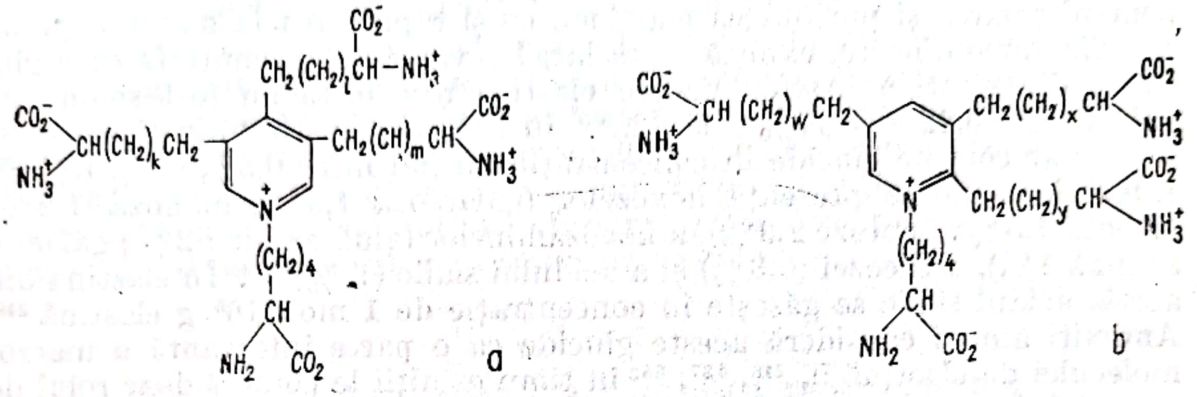
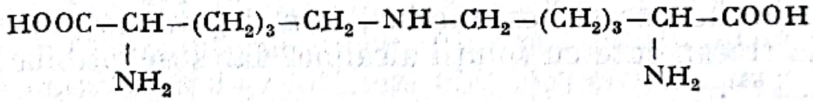


Fig. 19. Structura desmozinei (a) şi a izodesmozinei (b). $k + l + m = 4$; $w + x + y = 4$.

Un alt aminoacid, identificat recent în compoziţia elastinei, X_4 sau lizino-norleucina, este reprezentat prin formula N^{ε} — (5-amino 5-carboxi-pentanil) — lizină, sau :



şi derivă, probabil, din două molecule de lizină [349].

Interesul particular al acestor noi aminoacizi se datoreşte participării lor la constituirea legăturilor transversale între lanţurile polipeptidice, ceea ce conferă macromoleculelor de elastină proprietăţile fizice caracteristice elastomerilor.

Distribuţia aminoacizilor în lanţurile polipeptidice ale elastinei este puţin cunoscută şi nu s-a semnalat pînă acum o repetare strictă a anumitor secvenţe, aşa cum s-a descris în lanţurile polipeptidice ale colagenului. Prin hidroliza parţială a elastinei cu acizi organici au fost obţinute două fracţii solubile, denumite alfa- şi beta-elastină, avînd greutăţi moleculare de 60 000 — 84 000 şi, respectiv, 5 500 şi o compoziţie în aminoacizi similară cu cea a elastinei native [831].

Studiul grupelor amino terminale ale acestor fracţiuni sugerează că alfa-elastina reprezintă un agregat macromolecular alcătuit din 17 lanţuri polipeptidice, conţinînd fiecare aproximativ 35 de rezidii de aminoacizi, glicina, alanina, valina, leucina şi acidul aspartic ocupînd poziţii terminale; beta-elastina ar fi alcătuită numai din 2 lanţuri polipeptidice, cu 27 de rezidii de aminoacizi.

Scanned with OKEN Scanner

Analiza componentei glucidice

Prezenţa glucidelor în constituţia elastinei a fost sugerată de apariţia substanţelor reducătoare în lizatele de ţesut elastic; această observaţie a stat la baza ipotezei structurii glicoprotidice a elastinei [68]. Ulterior, existenţa componentei glucidice a fost atestată de numeroase investigaţii biochimice, histochimice şi enzimatice. Diversitatea metodelor utilizate pentru izolarea şi purificarea elastinei, ca şi raportarea la material prelevat din surse diferite, explică scara largă a valorilor atribuite fracţiei glucidice din elastină. Astfel, pentru elastina din aortă au fost semnalate valori între 0,22 — 0,47% [68] şi 2% [443], în timp ce, elastina din *ligamentum nuchae* ar conţine glucide în concentraţii variind între 0,5% [443] şi 8% [439]. A fost identificată prezenţa hexozelor (galactoză 1,9%; manoză 1,2%; glucoză 1,3%; pentoze 2,9%), a hexozaminelor (glucozamină 2%; galactozamină 1%), a fucozei (0,3%) şi a acidului sialic (1 %) [758]. În elastina din aortă, acidul sialic se găseşte în concentraţie de 1 mol/ 10^5 g elastină [248]. Anumiţi autori consideră aceste glucide ca o parte integrantă a macromoleculei de elastină [71, 248, 437, 662] în timp ce alţii le conferă doar rolul de material de contaminare [829]. S-a constatat că ar exista o corelaţie între bogăţia în glucide a elastinei şi intensitatea coloraţiei cu rezorcin-fucsină a fibrelor elastice [58].

Proporţiile relative ale monozelor, menţionate anterior, au sugerat că în elastină glucidele ar exista sub forma a două fracţii : o fracţie cu structura keratosulfatului, mai slab legată de restul macromoleculei (deci mai uşor şi mai rapid hidrolizabilă) şi o fracţie de tip glicopeptidic, alcătuită din acid sialic, hexoze şi hexozamine, ferm legată de proteina elastinei, rezistentă la tratamente cu soluţii alcaline, dar susceptibilă la digestia cu elastomucază [662].

Analiza componentei lipidice

Eliberarea unui material cu proprietăţile lipidelor (sudanofilie, osmiofilie, reactivitate la soluţia Schiff, colorabilitate cu albastru de Nil) în cursul elastolizei a sugerat ipoteza că elastina reprezintă o lipoproteină [628]. Autofluorescenţa elastinei normale, ca şi a materialului din leziunile de *pseudoxantoma elasticum*, ar rezulta din autooxidarea acestei componente lipidice [1005]. Persistenţa prelungită a fluorescenţei după extracţii cu piridină sau metanol/cloroform, ca şi dispariţia ei după tratamente cu elastază, indică o mare stabilitate a legăturilor dintre fracţiile protidice şi lipidice ale macromoleculei de elastină. Datele de morfologie pledează, de asemenea pentru prezenţa lipidelor în fibrele elastice; în acest sens, menţionăm cercetări care demonstrează că la animalele cu dietă hipercolesterolemică, particulele fine de lipide care traversează peretele arterial sînt absorbite, sub formă de lipoproteine, pe miceliile de elastină, fiind ulterior încorporate în fibrele elastice ale intimei aortei [940].

Scanned with OKEN Scanner

Componenta lipidică ar constitui aproximativ 0,5% din greutatea uscată a elastinei; ea conţine acizi graşi nesaturaţi şi are structură asemănătoare sfingomielinei [605]. Investigaţii experimentale, în care s-a urmărit dinamica stabilităţii structurale a fibrelor elastice la animalele ţinute la un regim bogat în acizi graşi saturaţi, au demonstrat că includerea acestor acizi în complexul macromolecular al elastinei duce la diminuarea stabilităţii structurale a fibrelor, apărînd aspecte de fragmentare şi de liză.

Din punct de vedere funcţional, rolul fracţiei lipidice este încă departe de a fi clarificat. Anumite cercetări subliniază că, integrate în complexe cu glucidele şi proteinele, lipidele ar juca rolul de ciment stabilizator interfibrilar, apărînd astfel ca un component principal al zonei amorfe a fibrei elastice [63]. Reamintim că eliminarea din fibre a fracţiilor lipidice a fost incriminată ca mecanism iniţial de formare a plăcilor de ateroscleroză şi ca nucleu iniţial de precipiatare a sărurilor de calciu.

Organizarea macromoleculară şi corelaţia structură-funcţie

Prin analogie cu polimerii sintetici de tipul cauciucului, cu care elastina are comună proprietatea de elasticitate, s-a sugerat alcătuirea biopolimerului din lanţuri macromoleculare plisate şi orientate la întîmplare, interconectate prin numeroase legături transversale [829]. Această structură ar caracteriza din punct de vedere fizico-chimic un „elastomer", indiferent de provenienţa sa. El conţine zone în care lanţurile constitutive se pot mişca liber faţă de lanţurile vecine, fiind posibile şi importante procese de rotaţie. Mobilitatea este cu atît mai mare, cu cît legăturile tranversale dintre lanţuri sînt mai reduse. În condiţii de repaus, orientarea lanţurilor este total neordonată, corespunzînd unei entropii maxime. Punerea în tensiune a sistemului, de exemplu prin exercitarea unei tracţiuni mecanice, antrenează alungirea lui, depăşind de 2 — 3 ori lungimea iniţială. În cursul acestui proces, lanţurile se deplasează uşor unele faţă de altele, tind să devină mai rigide şi să se orienteze în direcţia forţei de tracţiune. Cu cît există spaţii mai mari între două legături transversale, cu atît flexibilitatea lanţurilor va fi mai mare şi elasticitatea sistemului mai eficientă. Cînd *stress*-ul încetează, elastomerul revine la dimensiunile iniţiale.

S-a sugerat că, în cazul elastinei, posibilitatea mişcării libere a lanţurilor polipeptidice ar fi asigurată de marea bogăţie în aminoacizi apolari, respectiv a unor substanţe care fac puţine legături intermoleculare. Această ipoteză nu este însă susţinută de prezenţa unui număr mare de aminoacizi polari în rezilină, proteină structurală izolată din cuticula insectelor şi care este unul dintre cei mai perfecţi bioelastomeri cunoscuţi pînă acum [23]. Pare deci mai probabil că în ambii biopolimeri joacă un rol important secvenţa aminoacizilor situaţi între legăturile transversale şi, în special, distribuţia inelelor pirolidinice ale prolinei, care nu permit formarea unui alfa-helix cu punţi de hidrogen intramoleculare. În sprijinul acestei ipo-

Scanned with OKEN Scanner

teze pledează şi studiile de difractometrie, care evidenţiază absenţa arcurilor meridionale (*fig. 20*), sugerînd lipsa unei organizări cu un anumit grad de cristalinitate, a macromoleculei de elastină. Faptul că există, totuşi, 4 inele de difracţie, situate la 8,9 — 4,4 — 2,2 şi 1,12 Å [399], indică o structură mai complicată decît a polimerilor amorfi, care prezintă de obicei numai 2 inele de difracţie.

Prezenţa legăturilor transversale, al doilea parametru structural de care depind proprietăţile fizico-chimice ale elastomerilor, a fost constant evidenţiată în diferite macromolecule de elastină. Aceste legături asigură elastinei rezistenţă la metodele chimice uzuale de degradare şi la digestiile cu proteaze nespecifice, explicînd şi aspectul sigmoid, cu o perioadă de lag, al curbei de solubilizare prin agenţi specifici. Natura legăturilor transversale a fost analizată în hidrolizatele de elastină, obţinute după digestii enzimatice exhaustive. Din aceste date a rezultat că desmozinele reprezintă agenţii principali de formare a legăturilor transversale, avînd capacitatea de a interconecta, prin intermediul celor 4 catene laterale de care dispun, 2 sau 4 lanţuri polipeptidice independente [95], [832]. Studii de biogeneză, asupra cărora vom insista în paginile următoare, demonstrează că, prin condensarea a 4 rezidii de lizină situate în lanţuri diferite, se formează o desmozină (termen generic pentru ambii izomeri) şi, respectiv, apare o legătură transversală. Importanţa legăturilor transversale în stabilizarea structurală a elastinei reiese din observaţia că solubilizarea fibrelor apare mult mai rapid dacă, în prealabil, aceste legături sînt distruse, prin ruperea inelelor piridinice ale desmozinelor, consecutiv unui proces de oxidare. Conţinutul în desmozine al elastinei este de aproximativ 3 rezidii pentru 1 000 de aminoacizi şi fiecare aminoacid polifuncţional poate lega pînă la 4 lanţuri polipeptidice ; rezultă deci că există aproximativ 1 punct de interconectare prin legături transverale, la fiecare 80 de rezidii de aminoacizi [851]. Un alt tip de legături transversale a fost semnalat prin identificarea lizinonorleucinei în fracţiunea hidrolizatelor de elastină care conţin şi desmozinele [349]. Acest aminoacid, derivat din 2 rezidii de lizină, poate conecta 2 lanţuri polipeptidice alăturate.

Studii comparative asupra variaţiilor ontogenetice ale proprietăţilor elastinei au demonstrat că această macromoleculă posedă un anumit grad de insolubilitate înainte de formarea extensivă a desmozinelor şi a lizinonorleucinei. Această constatare a sugerat ipoteza existenţei unui al treilea tip de legături transversale, a căror apariţie precede condensarea rezidiilor de lizină ce duce la sinteza desmozinelor [22]. El a fost corelat cu prezenţa ditirozinei în macromolecula de elastină [612], component ce nu a mai fost identificat în alte structuri, nici în stare liberă, nici integrat în complexe macromoleculare, cu excepţia rezilinei [21]. Ditirozina apare, probabil, prin formarea unei legături bifenilice între 2 rezidii de tirozină. Concentraţia ei în elastina umană este mai mare în viaţa intrauterină, la noul-născut rămînînd numai urme [611] ; pare probabil că formează în mod tranzitoriu legături transversale, fiind ulterior încorporată în compuşi polifenolici.

Se consideră că legăturile intermoleculare formate [prin derivaţi multipli

Fig. 20. Difractograma la raze X a elastinei uscate (GOTTE, MAMMI și PEZZIN [389], reprodus cu permisiunea editurii Butterworths).

A

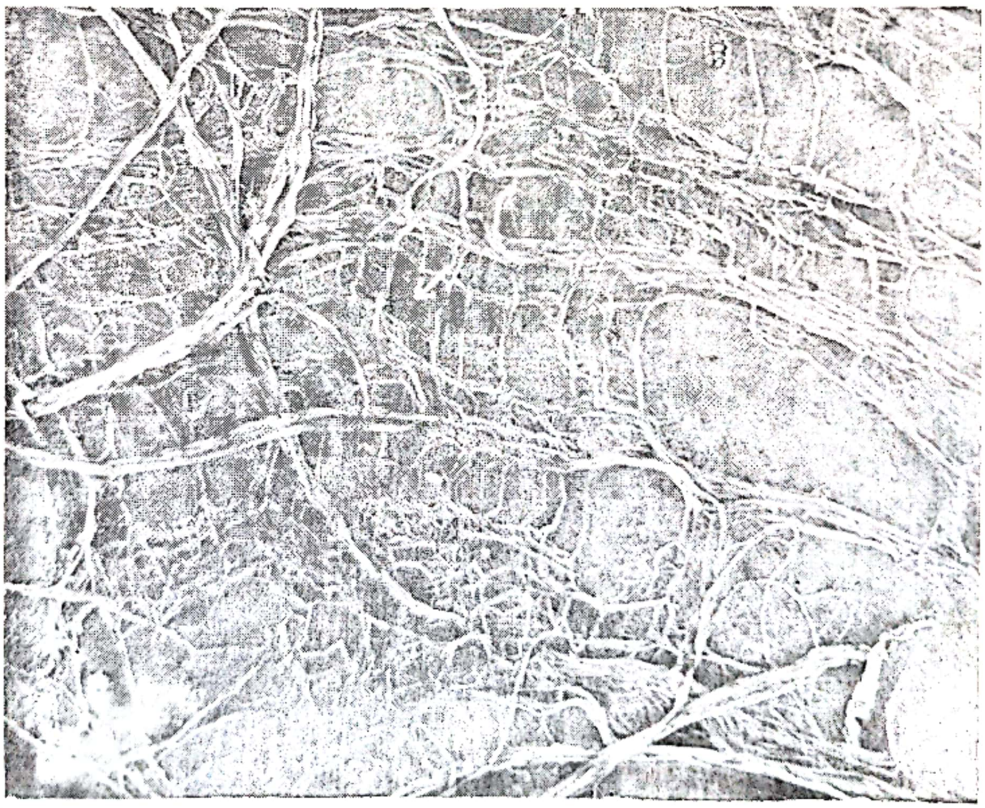


Fig. 21. Aspectul electronomicroscopic al țesutului elastic, cu evidențierea componentei fibrilare. Săgeata indică filamente cu diametrul de aproximativ 15 Å (× 100 000), (GOTTE și SERAFINI—FRACASSINI [397], reprodus cu permisiunea editurii Elsevier).

Scanned with OKEN Scanner

ai lizinei (desmozine), ar stabiliza în special conformaţia planară a lanţurilor polipeptidice. Menţinerea acestora într-un sistem tridimensional este probabil realizată prin apariţia unor legături hidrofobe, stabilite între rezidiile de aminoacizi apolari [988].

Pentru explicarea dispoziţiei sterice a lanţurilor polipeptidice în complexul macromolecular al elastinei au fost propuse variate tipuri de „modele". Astfel, una dintre ipoteze sugerează formarea elastinei din unităţi proteice elementare, interconectate prin molecule glucidice [67,841]. Utilizarea variatelor enzime ce intră în complexul elastazei a permis adîncirea acestor studii pînă la evidenţierea a 5 subunităţi, dintre care 4 cu caracter proteic şi cu constituţie similară, în timp ce a 5-a ar fi alcătuită dintr-un complex incluzînd hexoze-pigment şi proteină. Cele 4 subunităţi proteice ar fi legate de cea de a 5-a prin legături de tip ester, la care participă grupările carboxil libere ale acizilor aspartic şi glutamic, legături ce ar constitui sediul primar al atacului elastazei [1158]. Mai recent, pe baza studiilor asupra proprietăţilor de excluzie moleculară a preparatelor de elastină, a fost sugerat un model alcătuit dintr-o reţea tridimensională, cu dispoziţie tetraedrică, formată din unităţi globulare cu diametrul de aproximativ 50 Å şi cu o greutate moleculară în jur de 50 000. Aceste particule sînt astfel agregate încît lasă între ele „pori" cu diametrul efectiv de 30—33 Å, realizînd un spaţiu liber total ce ocupă 66% din volumul tetraedrului. Aceşti corpusculi ar reprezenta „precursorii" elastinei, avînd la suprafaţa lor rezidiile de lizină capabile să interacţioneze pentru a forma desmozinele ce dau naştere la legăturile transversale.

În lumina datelor actuale se admite tot mai mult ipoteza că macromoleculele incluse în complexul denumit elastină realizează un sistem bifazic, caracterizat printr-o componentă proteică cu organizare fin fibrilară şi o matrice amorfă de natură glicoprotidică sau glicolipoprotidică [397, 443]. Modul de structurare a componentei proteice apare mai net după elastoliză parţială şi după tratamentul ultrasonic al fibrelor (*fig. 21*); acest procedeu, determinînd diminuarea materialului din matricea fibrei, permite vizualizarea unor formaţiuni fibrilare fine, cu diametrul de aproximativ 80 Å, fără periodicitate, iar la o rezoluţie şi mai mare apar filamente fine cu diametrul de aproximativ 15 Å [238,397]. Acestea ar reprezenta prima treaptă în ierarhia structurală a fibrelor elastice din diverse surse. Aspectul lor electronomicroscopic sugerează analogia cu filamentele extracelulare denumite „microfibrile" şi care au fost descrise ca unităţi elementare ale tuturor tipurilor de fibre din ţesutul conjunctiv [673]. În ceea ce priveşte componenta amorfă, ea ar fi reprezentată de cimentul ce se depune între reţelele fibrilare, menţinîndu-le în relaţii spaţiale şi funcţionale adecvate. Această matrice interfibrilară apare bogată în glucide şi în aminoacizi polari (dicarboxilici şi diaminici), incluzînd astfel un mare număr de grupări hidrofile prin intermediul cărora se asigură gradul de hidratare necesar extensiei şi revenirii la normal a catenelor polipeptidice prezente în unităţile constitutive elementare ale fibrelor. Dintre glucide, o atenţie deosebită s-a acordat acidului sialic, care ar fi un important factor de legătură între macromoleculele din cimentul interfibrilar şi macromole-

Scanned with OKEN Scanner

culele din fibrile. Variaţiile cantitative ale fiecărei substanţe în parte alterează paternul metabolic al complexului fibrilar, rezultînd atît modificările caracteristice senescenţei, cît şi cele evidenţiate în cursul proceselor patologice.

SINTEZĂ

Formarea constituienţilor elementari ai elastinei urmează căile generale de biosinteză a proteinelor, glucidelor şi lipidelor. Prezenţa, în mod particular în elastină, a unor aminoacizi polifuncţionali, implicaţi în formarea legăturilor transversale dintre lanţurile polipeptidice, a orientat investigaţiile de biogeneză spre studiul apariţiei lor.

Sinteza desmozinelor şi a lizino-norleucinei

Cercetările efectuate în acest domeniu au analizat atît mecanismul de formare a legăturilor transversale, cît şi integrarea acestui mecanism în etapele generale de formare a fibrelor elastice.

Prin administrarea de aminoacizi marcaţi s-a putut demonstra, în sisteme biologice variate, că sinteza desmozinei şi izodesmozinei rezultă din condensarea a 4 rezidii de lizină (*fig. 22*). Dovada directă a fost obţinută în culturi de ţesuturi de aortă embrionară, constatîndu-se că, după adăugarea lizinei C_{14} la mediul de cultură, radioizotopul apare mai întîi în lizina din lanţul peptidic, şi ulterior în desmozine [743, 833]. Hidroliza alcalină scindează lanţul lateral ataşat de azotul inelului piridinic al desmozinelor, liberînd lizina marcată, a cărei activitate reprezintă 1/4 din activitatea totală [30].

Într-o primă etapă a sintezei desmozinelor are loc dezaminarea oxidativă a 3 molecule de lizină, cu apariţia unor produşi intermediari de tipul semialdehidei acidului alfa-amino adipic. Existenţa acestui stadiu intermediar aldehidic a putut fi evidenţiată atît histochimic, prin reactivitatea elastinei la clorhidratul de 3-metil-2 benzotiazolon hidrazonă din tehnica Savicki [745, 783], cît şi biochimic, prin identificarea a 6 grupări aldehidice pentru fiecare 1 000 de rezidii de amino acizi [745]. Ulterior, cele 3 rezidii de lizină posedînd grupări aldehidice, vin în apoziţie cu a 4-a moleculă de lizină nemodificată, situată pe un lanţ polipeptidic diferit. Acest rezidiu furnizează azotul său ε-amino pentru formarea inelului piridinic, proces care are loc în cursul unei reacţii de condensare ce implică, de asemenea, o oxidare echivalentă cu transferul a 2 electroni [830].

În alte lucrări se susţine intervenţia unor aminoxidaze în conversiunea lizinei în desmozine [570], enzime a căror activitate pare dependentă de prezenţa cuprului [1204]. Drept urmare, deficitul de cupru în dietă, ca şi lipsa piridoxinei, antrenează o reducere a activităţii aminoxidazice, rezul-

Scanned with OKEN Scanner

tînd o diminuare în formarea legăturilor transversale. Aşa se explică gradul redus de stabilizare structurală a fibrelor elastice la animalele ţinute la un regim cu deficit de cupru, sau cu latirism experimental [744], [808], [809]. Conversiunea patologică a normostabilităţii în hipostabilitate explică marea fragilitate a ţesutului elastic, ducînd la fragmentări şi lize

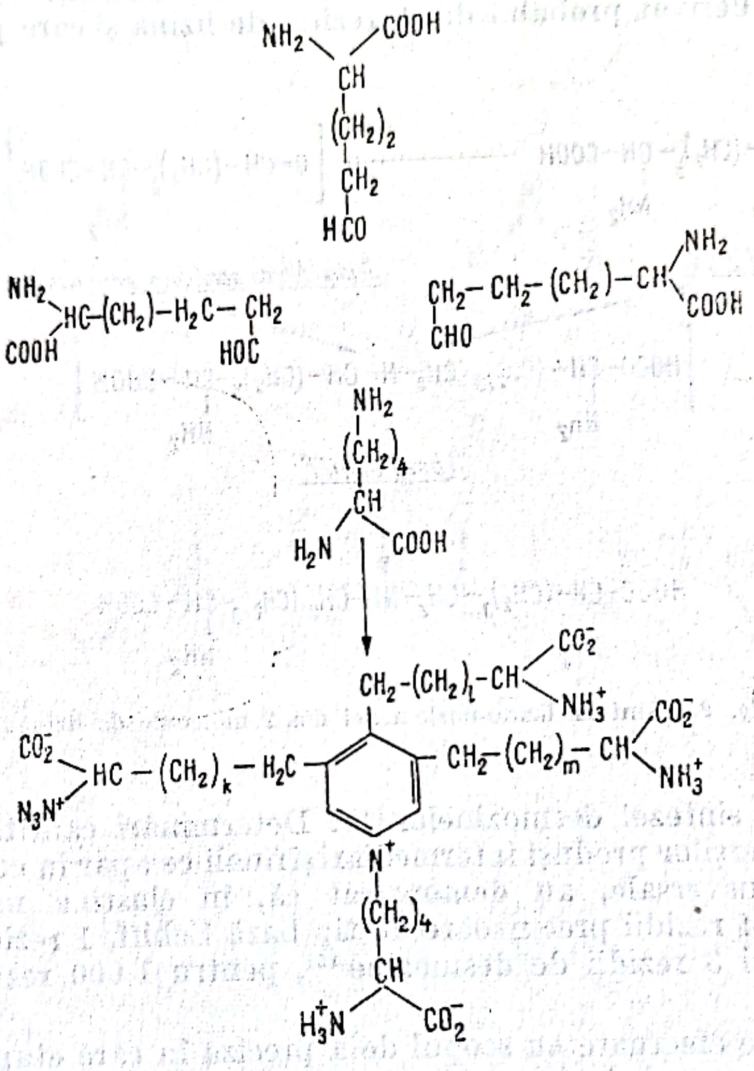


Fig. 22. Sinteza desmozinei din 4 rezidii de lizină.

fibrilare, iar, pe un plan mai particular, la rupturi valvulare şi anevrisme. În aceste cazuri s-au decelat valori ale lizinei depăşind de 3—4 ori pe cele normale [1025], precum şi o reducere corespunzătoare a cantităţii de desmozine [744].

În ceea ce priveşte sinteza lizino-norleucinei, structura sa sugerează ca precursori 2 molecule de lizină. S-ar produce mai întîi o oxidare a grupului ε-amino dintr-un rezidiu lizil, rezultînd o aldehidă, urmată de cuplarea acesteia cu grupul ε-amino al altui rezidiu de lizină. Ca etapă intermediară apare un produs de tip bază Schiff, care, apoi, este redus, dînd

naştere lizino-norleucinei [349], aşa cum apare în *fig. 23*. Ea se găseşte în cantităţi mai mici decît desmozinele, dar se consideră că procesul de sinteză este paralel cu al acestora din urmă. Procesul de condensare al rezidiilor de lizină duce la formarea unor produşi cu o complexitate crescîndă, pe măsură ce apar legăturile transversale (*fig. 24*). În sprijinul acestei observaţii pledează punerea în evidenţă a unor mici cantităţi de merodesmozină, compus derivat probabil din 3 rezidii de lizină şi care joacă rolul de

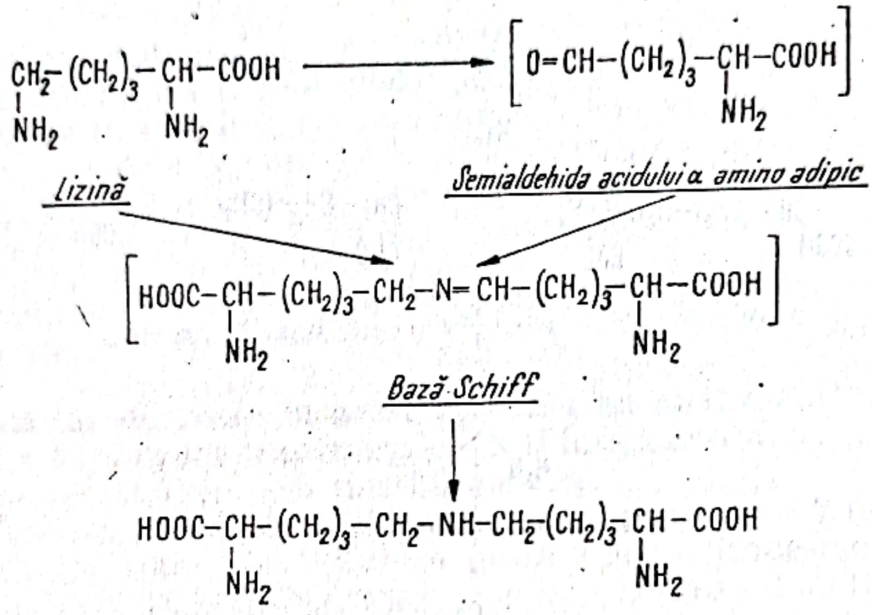


Fig. 23. Sinteza lizino-norleucinei din 2 molecule de lizină.

intermediar al sintezei desmozinelor [1026]. Determinări cantitative aproximative, ale diverşilor produşi intermediari şi finali ce apar în cursul formării legăturilor transversale, au demonstrat că, în elastina matură există aproximativ 1/4 rezidii precursoare de tip bază Schiff, 1 rezidiu de lizino-norleucină [638] şi 3 rezidii de desmozine [851], pentru 1 000 rezidii totale de aminoacizi.

Cercetările efectuate cu scopul de a preciza în care etapă a elastogenezei are loc procesul de formare a legăturilor transversale, sugerează că aceste legături apar după ce s-au constituit lanţurile polipeptidice în care este inclusă lizina. Aceste lanţuri reprezintă probabil precursorul solubil al elastinei, sau „proelastina", forma insolubilă apărînd lent, pe măsură ce se stabilesc interconectările dintre lanţuri. Investigaţii ontogenetice au permis să se constate că procentul de lizină scade cu cît embrionul se dezvoltă, această diminuare progresivă atingînd un maximum în a 14-a săptămînă a vieţii fetale. Paralel, se produce creşterea cantităţilor de desmozine şi de lizino-norleucină. Astfel, cu un anumit timp înainte de naştere, aproximativ 50 % din legăturile transversale prezente la adult, sînt deja formate [611].

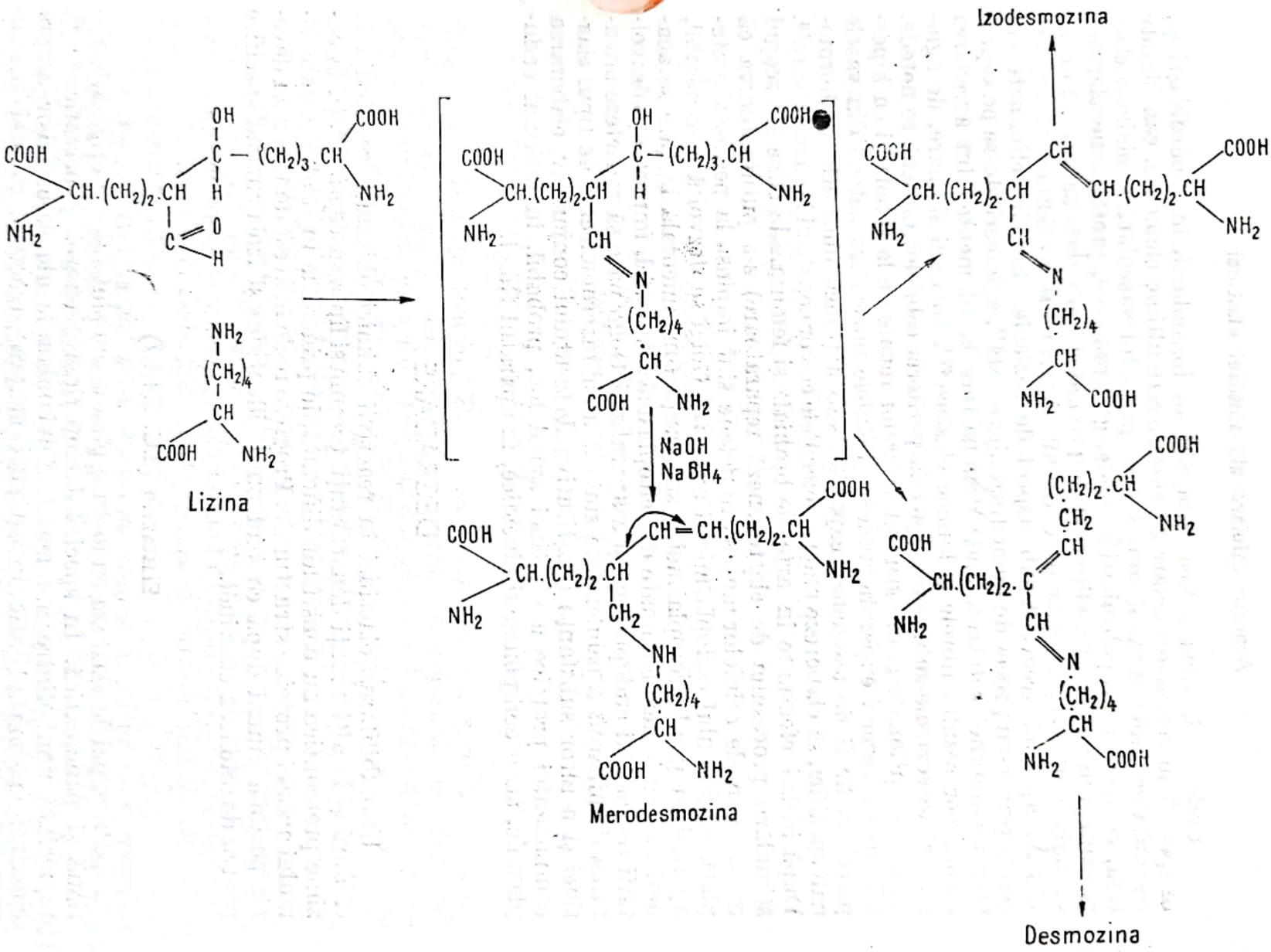


Fig. 24. **Etape în biosinteza aminoacizilor care formează legăturile transversale ale elastinei.**

Aspecte celulare ale sintezei elastinei

Sinteza elastinei a fost urmărită în fibroblaşti, în condroblaşti şi, în special, în celule musculare netede. Aceste ultime elemente, considerate ca unitatea funcţională dominantă a peretelui vascular, ar elabora elastină, colagen, mucopolizaharide acide, glicoproteine, proteine necolagene, precum şi miofibrile [1187]. Observaţiile privind sinteza elastinei au permis să se individualizeze, în aorta de om, unităţi globulare cu diametrul de 50—150 Å, apărînd frecvent sub aspect de vezicule. Ele sînt eliminate din celulă printr-un proces de pinocitoză „inversată", aglomerîndu-se pe suprafaţa membranei celulare, unde dau naştere la filamente, din agregarea cărora vor rezulta fibrele şi lamele elastice [473]. Imagini similare, de aglomerări de vezicule submicroscopice la periferia celulelor musculare netede, au fost menţionate şi din studiul arterelor renale de la şobolanii cu hipertensiune arterială experimentală [127]. Celulele musculare netede din vasele placentei ar fi de asemenea capabile, sub acţiunea unor stimuli hormonali specifici, să elaboreze macromoleculele ce vor constitui lamele elastice[13]. După incizii efectuate în arterele brahială şi femurală la cîine (cu scopul stimulării procesului de elastogeneză reparatoare) s-a putut observa că miofilamentele celulelor musculare netede sînt împinse la periferia protoplasmei, reticulul endoplasmic şi aparatul Golgi se dezvoltă considerabil, apărînd în jurul protoplasmei o substanţă fundamentală în care se acumulează veziculele eliminate din citoplasmă [776]. Astfel, importanţa dezvoltării reticulului endoplasmic şi a aparatului Golgi pare să reflecteze orientarea dominantă a celulei spre sinteza unor macromolecule de tipul elastinei şi a altor substanţe constitutive ale ţesutului conjunctiv, elaborarea componentei proteice a elastinei avînd loc, probabil, în reticulul endoplasmic, iar a componentei glucidice, în aparatul Golgi.

DEGRADARE

Insolubilitatea elastinei în reactivii chimici obişnuiţi, rezistenţa la căldură şi la alţi agenţi denaturanţi, precum şi lipsa susceptibilităţii la enzime proteolitice au constituit dificultăţile principale în studiul catabolismului acestei proteine structurale. Progrese reale în acest domeniu au devenit posibile numai după ce s-au putut identifica şi izola enzime specifice pentru degradarea elastinei.

Elastazele (E.C. 3.4.4.7)

Principalele elastaze cunoscute pînă acum sînt cele de origină bacteriană şi pancreatică. În special descoperirea elastazei pancreatice [56, 62], reprezintă unul dintre momentele fundamentale ale cercetărilor asupra elastinei, permiţînd atît investigaţii asupra structurii acestei macromolecule, cît şi asupra catabolismului ei.

Scanned with OKEN Scanner

ELASTAZA PANCREATICĂ

Sub această denumire se definește un complex enzimatic polifuncțional, ale cărui componente au fost treptat identificate, izolate și caracterizate, atît din punct de vedere al particularităților fizicochimice, cît și al particularităților activității specifice.

Inițial, au fost descrise în preparatele purificate de elastază două fracții : E_1 sau elastomucaza, ce liberează numai glucidele din elastină,

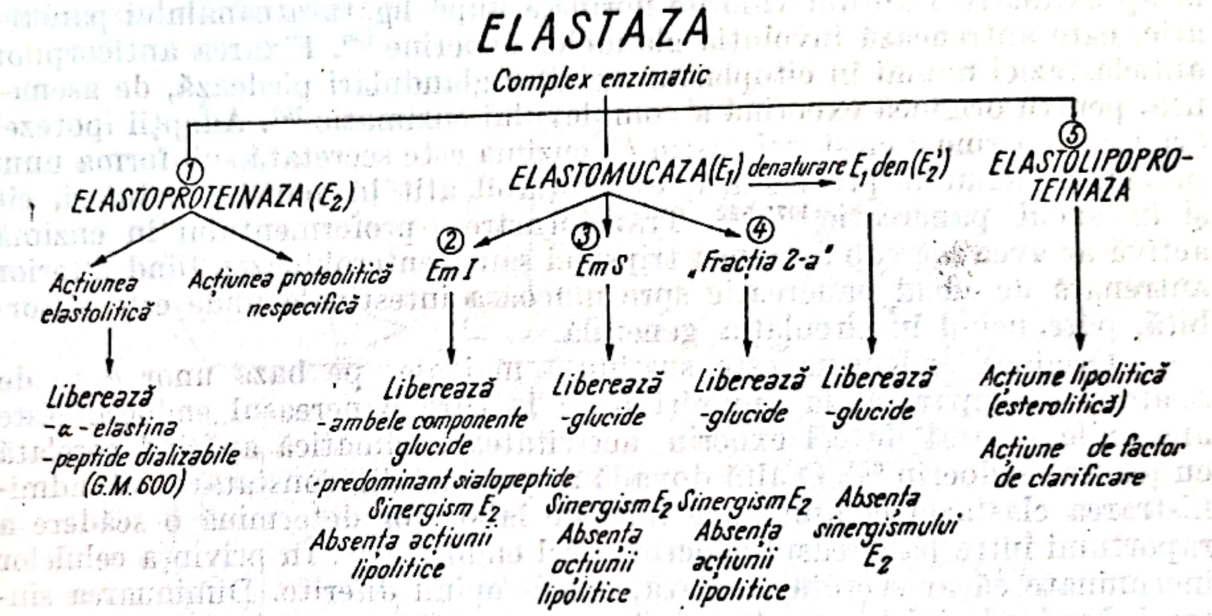


Fig. 25. Complexul enzimatic al elastazei și acțiunea componenților acestui complex.

fără a degrada și proteinele ; E_2 sau elastoproteinaza, care hidrolizează proteinele elastinei [436]. Ulterior, studii prin electroforeză pe hîrtie au permis individualizarea a trei fracții denumite : elastaza, elastomucoproteinaza și colagenmucoproteinaza [71]. După utilizarea cromatografiei pe coloană de DEAE-Sephadex [660, 663], numărul fracțiilor identificate a crescut la 5, incluzînd 3 fracții cu acțiune mucolitică, o elastoproteinază și o elastolipoproteinază (*fig. 25*).

Încercările de a preciza rolul diverselor fracțiuni ale elastazei în scindarea complexului macromolecular al elastinei a creat o nomenclatură extrem de bogată și de variată, uneori dificil de urmărit, de coroborat și de utilizat. De aceea, considerăm util prezentarea tuturor sinonimelor atribuite acestor fracții.

1. Pentru fracția cu acțiune asupra componentei proteice a elastinei există următoarele denumiri : elastoproteinază [436] ; elastază „reală" ; E_2 [436] ; component proteolitic al elastazei.

2. Pentru fracțiunile cu acțiune asupra componentei glucidice a elastinei există următoarele denumiri : *a*) elastomucază [436], ulterior considerată ca elastolipoproteinază [439] ; E_1 [436] ; elastomucoproteinază [73] ; *b*) frac-

ţia a 2-a [658]; *c*) E_2' [444]; E_1 den [658], ultima denumire fiind atribuită formei denaturate a elastomucazei.

3. Fracţiunea cu acţiune asupra componentei lipidice a elastinei este denumită elastolipoproteinază [663].

Locul de formare a elastazei pancreatice este încă mult discutat, existînd argumente asupra elaborării ei atît de către teritoriile exocrine, cît şi endocrine, ale organului respectiv.

Originea exocrină este susţinută, în primul rînd, prin prezenţa elastazei în sucul pancreatic [65, 79, 189], ca şi prin reducerea activităţii enzimei la aproximativ 1/10 din valorile normale după ligatura canalului pancreatic, care antrenează involuţia glandelor exocrine [189]. Fixarea anticorpilor antielastazici numai în citoplasma acinilor glandulari pledează, de asemenea, pentru originea exocrină a complexului enzimatic [757]. Adepţii ipotezei originii exocrine a elastazei susţin că enzima este secretată sub forma unui precursor denumit proelastază, evidenţiabil atît în acinii glandulari, cît şi în sucul pancreatic [407, 622]. Transformarea profermentului în enzimă activă ar avea loc sub acţiunea tripsinei sau a enterokinazei, fiind ulterior antrenată de sucul pancreatic spre mucoasa intestinală unde este absorbită, pătrunzînd în circulaţia generală.

Originea endocrină este susţinută mai ales pe baza unor date de anatomie comparată, la anumiţi peşti la care pancreasul endocrin este anatomic separat de cel exocrin, activitatea enzimatică apărînd corelată cu ţesutul endocrin [629]. O altă dovadă ar proveni din constatarea că, administrarea elastazei la animalele mici de laborator determină o scădere a raportului între pancreasul exocrin şi cel endocrin [185]. În privinţa celulelor incriminate că ar secreta elastaza, există opinii diferite. Diminuarea sintezei după administrarea de cobalt sau aloxan a sugerat că celulele alfa ar fi sursa principală [196]. Au mai fost implicate, de asemenea, celulele delta sau celulele stromei insulare.

Concentraţia elastazei pancreatice umane este apreciată, în condiţii fiziologice, la 208 unităţi (E.U.) pe g de ţesut [57]. Diferenţele remarcate între specii pot fi în parte corelate cu variabilitatea raportului între ţesutul exocrin şi endocrin al pancreasului. În ceea ce priveşte variaţiile în funcţie de vîrstă, au fost considerate fie nesemnificative, fie ca avînd implicaţii importante în patologia vasculară. Mai ales scăderea cantităţii de elastază după al 4-lea deceniu ar putea avea o influenţă negativă asupra metabolismului fibrelor elastice, favorizînd apariţia aterosclerozei [57, 932].

Cercetările asupra constituţiei chimice a elastazei au demonstrat că enzima se comportă ca o pseudoglobulină solubilă în apă [1069], avînd, în stare purificată, un punct izoelectric corespunzînd pH-ului 8,5 [444] sau 9,5 [645]. Valorile greutăţii moleculare obţinute prin diferite metode sînt relativ mici, variind între 25 000 [645] şi 28 000 [785]. Analiza aminoacizilor constitutivi a demonstrat că cele două componente principale, elastomucaza şi elastoproteinaza, reprezintă două entităţi autonome, ce se deosebesc atît cantitativ, cît şi calitativ.

Astfel, elastomucaza (E_1) conţine beta-alanină (care este absentă în elastoproteinază) şi are cantităţi mai mari de treonină şi glicină ca

Scanned with OKEN Scanner

fracţia proteolitică. Elastoproteinaza este bogată în arginină (aminoacid absent în elastomucază) şi înglobează cantităţi mai mari de acid glutamic, metionină, izoleucină, fenilalanină şi lizină decît fracţia glicolitică [875].

Cercetările privind particularităţile acţiunii catalitice a complexului enzimatic al elastazei au permis să se constante următoarele :

Elastoproteinaza prezintă o dublă activitate proteolitică : specifică (elastoliza) şi nespecifică.

Analiza mecanismului specific de acţiune a sugerat ipoteza că elastoliza constă într-un proces de depolimerizare, cu transformarea elastinei

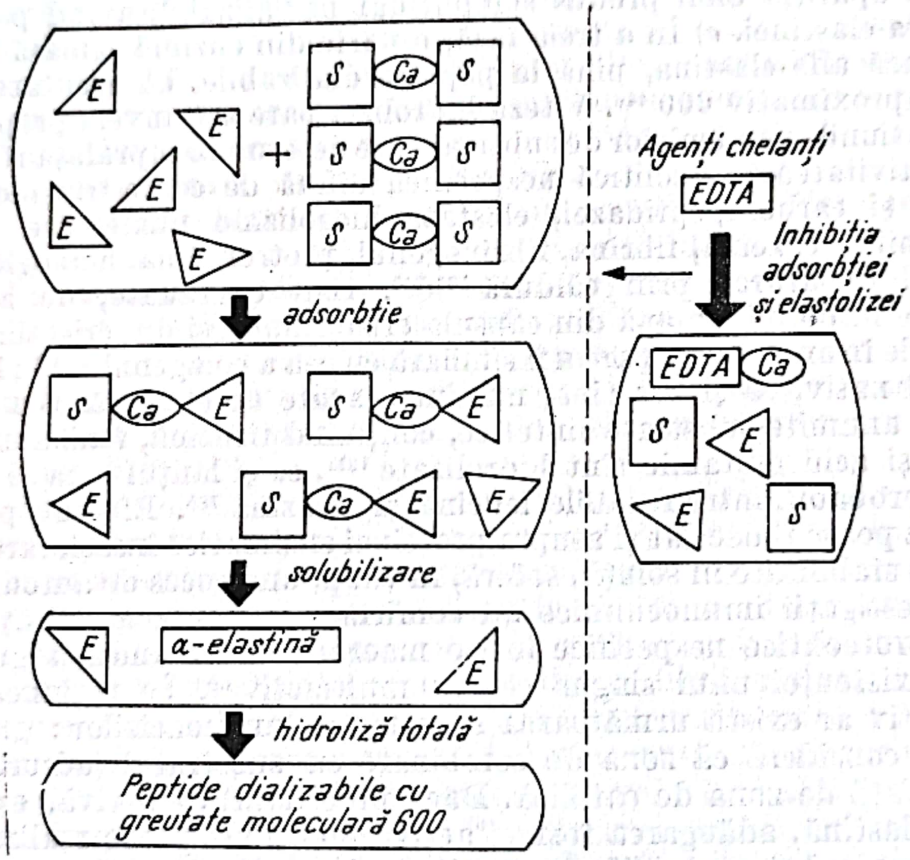


Fig. 26. Diagrama etapelor procesului de elastoliză şi efectul inhibitor al agenţilor chelanţi.

fibroase în elastină globulară [66]. Evidenţierea formării grupelor alfa-amino libere demonstrează însă că în cursul degradării elastinei sînt clivate legăturile peptidice, deci procesul reprezintă o proteoliză. Investigaţiile privind kinetica reacţiei au evidenţiat că elastoliza se produce în trei etape succesive (*fig. 26*) : *a*) Într-o primă fază, se formează complexul enzimă (E)-substrat (S), prin adsorbţia elastazei la suprafaţa elastinei. Acest proces este favorizat de „permeabilizarea" structurii de suprafaţă a substratului. Se pare că atît elastaza, cît şi elastina, există sub forma unei populaţii mixte

Scanned with OKEN Scanner

de monomeri şi dimeri, dimerii apărînd prin formarea legăturilor intermoleculare coordinative, stabilite prin intermediul atomilor de calciu. Complexul elastină-elastază s-ar realiza prin deplasarea unei molecule din dimerul substratului şi înlocuirea sa cu o moleculă de enzimă. Pentru apariţia activităţii enzimatice ar fi necesare prezenţa grupărilor carboxil şi hidroxil libere, atît în ferment, cît şi în substrat. Aceste grupări participă la formarea orbitei de coordinare a atomului de calciu comun în complexul elastină-elastază şi, astfel, se favorizează desfăşurarea fazei de adsorbţie [437]. Inhibiţia elastolizei prin agenţi chelanţi, de tipul EDTA, se produce datorită efectului competitiv exercitat faţă de calciu. *b*) A doua fază cuprinde reacţia enzimatică principală şi constă din solubilizarea substratului, cu apariţia unui produs solubil, dar nedializabil, avînd particularităţile alfa-elastinei. *c*) În a treia fază, o parte din enzimă rămasă în soluţie degradează alfa-elastina, pînă la peptide dializabile, cu greutate moleculară de aproximativ 600 [446]. Viteza hidrolizei pare a fi invers proporţională cu dimensiunile particulelor de substrat care determină suprafaţa reactivă [658].

Activitatea proteolitică nespecifică diferă de cea a tripsinei, chimotripsinei şi carboxipeptidazei, elastaza hidrolizînd numeroase substrate ca albumina, cazeina, fibrina, fibrinogenul, protrombina, hemoglobina sau colagenul denaturat prin căldură [43, 645]. Sînt degradate, de asemenea, proteinele insolubile în apă din capsula cristalinului şi din cristalin, a căror constituţie în aminoacizi pare a fi similară cu cea a colagenului [441]; în schimb colagenul nativ, ca şi keratina, nu sînt atacate de elastază. S-a mai constatat că anumite substrate sintetice, conţinînd tirozină, fenilalanină, acid aspartic şi acid glutamic sînt hidrolizate [1211], ca şi lanţul beta al insulinei, scindat, probabil, între rezidiile leucină şi tirozină [785]. Efectul proteolitic nespecific poate fi decelat şi asupra proteinei enzimatice însăşi, care, deşi are o relativă stabilitate în soluţii, suferă, în timp, un proces de autodigestie [621].

Investigaţii imunochimice au confirmat prezenţa activităţii elastolitice şi proteolitice nespecifice într-o macromoleculă unică, argumentînd ipoteza existenţei unui singur centru multiactiv [84]. În regiunea acestui centru activ ar exista următoarea secvenţă a aminoacizilor: gli-asp-sergli [785]. Se consideră că zona de combinare cu substratul (adsorbţia) este distinctă faţă de zona de cataliză. Dacă proelastaza, inactivă, este adsorbită pe elastină, adăugarea formei active a enzimei poate realiza, totuşi, solubilizarea substratului [407]. În sfîrşit, mai menţionăm că ar exista sedii diferite pentru cataliza enzimatică şi pentru activitate imunologică, întrucît anticorpii antielastază nu inhibă elastoliza [1157].

Activitatea elastazei poate fi inhibată prin săruri, ca şi prin acţiunea unor agenţi identificaţi în pancreas şi în ser. Prezenţa NaCl în concentraţie fiziologică reduce activitatea enzimatică cu 50—75%; un efect similar îl au şi concentraţiile mai mari de NaCl. Dintre ionii bivalenţi, cuprul în concentraţie de 10^{-3} M exercită cel mai important rol inhibant asupra elastazei pancreatice [645]. S-a constatat, de asemenea, reducerea activităţii elastazei în soluţiile tampon ce conţin citrat sau fosfat, ca şi agenţi chelatori de tip EDTA, argumentîndu-se astfel ipoteza rolului ionilor de calciu în elastoliză [442]. Influenţa electroliţilor se manifestă numai asupra activită-

Scanned with OKEN Scanner

ţii elastolitice, în timp ce activitatea proteolitică nespecifică pare practic nemodificată [20].

Inhibitorul pancreatic al elastazei, a cărui prezenţă a fost sugerată de multă vreme [56], a putut fi izolat sub forma unei fracţii proteice nedializabile [659], denumită IE_2. Acest agent inhibitor acţionează asupra elastoproteinazei, fără a influenţa elastomucazele.

În ceea ce priveşte inhibitorul seric al elastazei, el apare în fracţia $alfa_2$ globulinică [660,661], fiind foarte stabil între limite largi de pH, de la 6 la 10; prezintă însă un anumit grad de termolabilitate. Problema dacă există o relaţie între inhibitorul elastazei şi cel (sau cei) al tripsinei, constituie încă un subiect de discuţii. Ipoteza susţinînd identitatea lor [903] este argumentată de evidenţierea acţiunii inhibante asupra elastazei, exercitată de două proteine din serul uman (cunoscute şi ca inhibitoare ale tripsinei) şi anume: 3,5 S $alfa_1$-glicoproteina şi $alfa_2$-macroglobulina [85]. Alte lucrări pun la îndoială existenţa unor inhibitori comuni ai elastazei şi tripsinei [56]; în lumina acestor rezultate s-ar părea că numai activitatea proteolitică nespecifică a elastazei este inhibată semnificativ de inhibitorii tripsinei, în timp ce elastoliza pare puţin modificată. Mai menţionăm constatarea că există o mare deosebire de stabilitate structurală între complexul alcătuit din inhibitor+elastază+tripsină şi cel alcătuit numai din inhibitor+tripsină, primul disociindu-se de aproximativ 100 de ori mai rapid, în comparaţie cu al doilea [1201], precum şi observaţia că, pentru elastază însăşi, ar exista în ser mai multe tipuri de inhibitori, fiecare acţionînd specific pe fracţia elastoproteinazică, elastomucazică sau colagen-mucoproteinazică [64].

Valorile citate în literatură pentru inhibitorul elastazei variază, în serul normal, între 20 ± 5 % [185] şi 55—66 % [1156]. Activitatea se modifică cu vîrsta şi cu anumite condiţii speciale, fiziologice sau patologice. Sensul în care apar aceste variaţii este încă puţin clarificat. În cursul sarcinii s-au notat valori semnificativ crescute ale inhibitorului seric (de la 26 % la 59 %), antrenînd modificări în metabolismul fibrelor elastice [669]. Creşterea nivelului seric al antielastazei a mai fost semnalată şi în diabet, ciroze hepatice, boli cardiovasculare etc. Interesantă din punct de vedere patogenic este observaţia privind diminuarea valorilor inhibitorului seric în fazele incipiente ale aterosclerozei [70]; alte investigaţii nu au semnalat însă reducerea inhibitorului seric în ateroscleroză.

Determinarea pH-ului optim pentru fracţiunile izolate şi purificate ale elastazei indică valoarea de 8,7 pentru elastoproteinază şi de 7,8 pentru componenta mucolitică [442].

Definirea unităţii enzimatice (E.U.), pare să depindă, în primul rînd, de metodologia utilizată. De exemplu, se apreciază drept unitate de elastază cantitatea de enzimă care dizolvă 50% din cele 20 mg de elastină prezente în sistemul de reacţie, în decurs de 30 de minute [1069]. Alţi cercetători exprimă activitatea enzimatică în mg de elastază necesare pentru solubilizarea a 50 % din cele 50 mg elastină, puse în sistemul de reacţie [658]. Se consideră, în general, drept unitate, cantitatea de enzimă necesară pentru a solubiliza 1 mg de substrat în 30 de minute, în condiţiile metodo-

Scanned with OKEN Scanner

logice folosite, iar activitatea specifică se apreciază prin numărul unităţilor enzimatice pe mg de preparat.

Elastomucaza realizează scindarea componentei glucidice din complexul macromolecular al elastinei, exercitînd, în acelaşi timp, şi un efect sinergic elastolitic. În prezenţa unui conţinut de aproximativ 20 % de elastomucază, activitatea elastoproteinazei este intensificată cu peste 50 % [436].

Elastomucaza are o greutate moleculară de aproximativ 25 000 [658] şi un pH optim în jur de 7,8. Utilizarea metodelor complexe de separare şi caracterizare biochimică (electroforeza, cromatografia pe coloană) a permis să se constate că elastomucaza reprezintă un amestec de fracţiuni enzimatice a căror activitate variază ca intensitate şi calitate. Astfel, s-au putut individualiza : a) o colagen-mucoproteinază, care ar elibera mucoidul$_2$ din fibrele de colagen din tendon şi b) o elastomucoproteinază, care eliberează lipopolizaharidul conţinînd acid sialic, prezent în fibrele elastice [73]. Clivarea concomitentă a glucidelor şi a lipidelor a sugerat utilizarea termenului de elastolipomucoproteinază pentru această ultimă fracţie [438]. A fost izolată însă o componentă independentă cu acţiune lipolitică, pentru care se recomandă denumirea de elastolipoproteinază [663]. Investigaţii mai complexe au permis identificarea a trei componente enzimatice cu acţiune predominant glicolitică [662] : a) Elastomucaza I (Em I), prezentă în preparatele de elastoproteinază şi care scindează ambele componente glucidice din elastină, fiind activă în special asupra sialopeptidelor ; în acelaşi timp, exercită o acţiune de potenţare a activităţii elastoproteinazei ; b) Elastomucaza S (Em S), prezentă în extractul pancreatic după îndepărtarea elastoproteinazei ; c) „fracţia a 2-a", localizată pe electroforegrama pe hîrtie prin 2 benzi, cu migrare relativ superpozabilă cu Em I şi Em S.

Constituţia chimică a elastomucazei se caracterizează prin bogăţia în acid sialic şi hexozamine, prezente în cantitate mai mare în fracţia Em S, în comparaţie cu Em I. Forma denaturată a enzimei glicolitice, individualizată în preparatele de elastază sub denumirea E_2' [444] sau E_1^{den} [658] are un conţinut mai redus în glucide şi nu exercită efectul de potenţare a activităţii elastoproteinazei.

Elastolipoproteinaza, identificată şi caracterizată ulterior [663], se prezintă ca o beta-globulină şi are acţiune specifică esterolitică asupra componentei lipidice din elastină. Asimilarea ei cu elastomucaza [439] s-a datorat faptului că lipidele pot fi liberate şi prin hidroliza componentei glucidice asociate. Anumite date sugerează similitudinea (sau chiar identitatea) între elastolipoproteinază şi lipoproteinlipază. Argumentarea acestei ipoteze se bazează pe : *a*) prezenţa lipoproteinlipazei în fracţia beta-lipoproteică a plasmei postheparinate ; *b*) termolabilitatea ; *c*) prezenţa unui acceptor pentru acizii graşi (de exemplu, sărurile de calciu), ca o condiţie necesară desfăşurării ambelor activităţi enzimatice ; *d*) simi-

Scanned with OKEN Scanner

litudinea inhibitorilor celor două tipuri de fermenţi (sulfatul de protamină, heparina, clorura de sodiu 1 M, sărurile biliare etc.) [663].

Privind în ansamblu cunoştinţele actuale asupra degradării enzimatice specifice a elastinei, reiese clar faptul că datele aparent contradictorii privind acţiunea elastazei au fost generate de insuficienta cunoaştere a tuturor componentelor acestui complex enzimatic. Acţiunea sinergică, predominantă sau exclusivă a fiecăreia dintre fracţiile constitutive în funcţie de condiţiile de mediu (pH, concentraţia substratului, particularităţile sale de agregare moleculară, prezenţa electroliţilor şi a inhibitorilor specifici serici sau/şi tisulari) explică variabilitatea rezultatelor obţinute.

În afara elastazei pancreatice, prezenţa unei activităţi elastolitice a mai fost menţionată în plasmă [186,440], ca şi în stroma şi supernatantul eritrocitelor umane [972].

ELASTAZA BACTERIANĂ

Identificată iniţial în filtratul de cultură de *Pseudomonas pyocyanea*, enzima a fost găsită ulterior şi în culturile altor bacterii (*Bacillus subtilis mesentericus*), ca şi în culturile de fungi (*Actinomices*, *Streptomices*). Aceste preparate conţin însă şi proteinaze şi peptidaze nespecifice. Singura elastază izolată, cu un grad mai mare de puritate, este cea produsă în culturi de *Flavobacterium elastolyticum* [700], care se comportă ca o endopeptidază, avînd exclusiv activitate elastolitică, fără efect asupra altor proteine sau substrate sintetice. Determinarea rezidiilor de aminoacizi N — şi C — terminali în produşii de hidroliză sugerează că enzima clivează o legătură peptidică de tip prolină-glicină, legătură frecvent întîlnită în elastină.

Greutatea moleculară a elastazei bacteriene pare să fie mai mare decît a celei pancreatice; pH-ul optim în tampon Tris şi tampon borat este de aproximativ 7,4, permiţînd o activitate hidrolitică stabilă, de lungă durată [700].

Proteazele nespecifice

Pepsina. Se sugerează, în anumite investigaţii, un efect elastolitic al pepsinei, în timp ce în alte cercetări au apărut rezultate negative sau incerte. Este probabil ca efectul elastolitic să rezulte în realitate dintr-un proces de denaturare a elastinei, apărut la pH-ul acid al soluţiei enzimatice (pH 1—2), urmat de hidroliza nespecifică, realizată de pepsină asupra proteinei denaturate. Aspectul nespecific al acţiunii pepsinei mai este sugerat şi de constatarea că elastoliza prin elastază implică prezenţa grupărilor carboxil în substrat [445], în timp ce, pentru activitatea pepsinei, aceste grupe nu par esenţiale [327].

Tripsina şi *chimotripsina*, în stare purificată, nu exercită o acţiune elastolitică evidentă [1069].

Scanned with OKEN Scanner

Papaina şi *ficina*, enzime de origină vegetală, au efecte elastolitice[1069]. Este însă greu de exclus prezenţa unei fracţii elastazice contaminante.

Astfel, toate datele actuale privind existenţa unei acţiuni elastolitice, deosebită de cea exercitată de elastază, cer noi confirmări. Pînă atunci, problema degradării fibrelor elastice, în condiţii fiziologice şi patologice, pare strîns legată de elaborarea unor fermenţi de tipul celor ce alcătuiesc complexul enzimatic al elastazei.

CORELAŢIA COLAGEN-ELASTINĂ

Datele privind organizarea macromoleculară a colagenului şi elastinei şi modul cum se reflectă această organizare în particularităţile lor funcţionale, deschid noi perspective de înţelegere a corelaţiei dintre aceste două tipuri de macromolecule, precum şi dintre structurile fibrilare pe care le alcătuiesc.

Ipoteza conversiunii colagenului în elastină a fost sugerată atît de observaţii histologice, cît şi de anumite rezultate experimentale. Astfel, după tratare cu tampon borat la pH alcalin (8—9) sau cu metaperiodat de sodiu, colagenul capătă proprietăţi elastice, iar la microscopul electronic apare ca un material amorf, lipsit de periodicitatea caracteristică [181]. De asemenea, aşa-numitele „fibre mîncate de molii" evidenţiate în dermul uman după tratamente cu colagenază şi care prezintă o susceptibilitate anormală la elastază, au fost considerate ca un produs macromolecular intermediar între colagen şi elastină [561]. Ar mai fi de menţionat că, deşi fibrele elastice nu sînt degradate după digestie cu colagenază, analize efectuate cu ajutorul luminei polarizate au demonstrat că această enzimă produce alterări submicroscopice în organizarea macromoleculară a fibrelor [787].

Datele actuale de biochimie menţionează anumite particularităţi constitutive comune, cum ar fi bogăţia în glicină, prezenţa hidroxiprolinei şi a hidroxilizinei, sugerînd că atît colagenul, cît şi elastina, ar putea apare dintr-un precursor comun, sintetizat de celulele ţesutului conjunctiv şi că, în anumite condiţii patologice, modificarea paternului aminoacizilor colagenului îl poate apropia şi mai mult de constituţia elastinei. Nu există însă pînă acum dovezi asupra posibilităţii unei transformări a colagenului în elastină, sau invers. Faptul că după introducerea artificială de noi legături intermoleculare şi tratament hidrotermic, colagenul capătă unele din proprietăţile tinctoriale, electronomicroscopice şi funcţionale ale fibrelor elastice, sugerează că factorul principal al acestei aparente conversiuni nu este o modificare esenţială a paternului aminoacizilor, ci o alterare în organizarea macromoleculară şi în configuraţia sterică, care antrenează variaţii ale gradului de stabilitate structurală. Denaturarea prin căldură sau prin anumiţi agenţi fizici sau chimici degradează structura secundară a macromoleculei de colagen, lanţurile pierd orientarea helicoidală şi devin neregulat plisate, păstrînd însă legăturile dintre ele. Apar astfel particu-

Scanned with OKEN Scanner

larităţi fizico-chimice caracteristice unor elastomeri, după cum demascarea anumitor grupări reactive explică afinitatea pentru coloranţi ai ţesutului elastic, iar modificarea aranjamentului spaţial al macromoleculelor creează condiţia atacării unor secvenţe peptidice susceptibile la elastază [410]. Toate aceste date sugerează că nu ne aflăm în prezenţa unei conversiuni chimice, în înţelesul strict al cuvîntului, ci a unor noi tipuri de corelaţii între stabilitatea structurală şi particularităţile funcţionale ale biopolimerilor. În acelaşi timp, devine tot mai evident faptul că în organism colagenul şi elastina reprezintă macromolecule bine individualizate din punct de vedere chimic, între care par a exista variate forme intermediare. Exemple numeroase în acest domeniu se pot da şi pe linia evoluţiei filogenetice, unde, fie ambele macromolecule apar intricate, fie colagenul îndeplineşte anumite funcţii de ţesut elastic [856]. Menţionăm, în legătură cu acelaşi subiect, rezultatele analizelor noastre histochimice asupra membranelor bazale glomerulare din rinichiul de om. Aceste membrane, deşi conţin o mare cantitate de colagen, nu prezintă electronomicroscopic structuri fibrilare, nu au o organizare cristalină a macromoleculelor, sînt bogate în hidroxilizină şi susceptibile la digestia cu elastază [1141]. Este probabil ca aceste membrane, adaptate distensiilor bruşce şi filtrării sub presiune mare intraluminală, să reprezinte unul dintre tipurile intermediare de organizare macromoleculară între fibra de colagen şi cea elastică, cu particularităţile funcţionale ale elastomerilor. Fibrele oxitalanice descrise recent, prezintă afinităţile tinctoriale ale elementelor elastice, sînt susceptibile la elastază după oxidare cu acid periodic şi par a constitui, de asemenea, un produs intermediar de organizare macromoleculară între colagen şi elastină [357, 358].

Deşi investigaţiile în domeniul corelaţiilor colagen-elastină sînt încă destul de limitate, credem că importanţa lor nu poate scăpa atenţiei cititorului. Cunoaşterea lor treptată va contribui la o înţelegere mult mai adîncă a numeroase procese fiziologice şi patologice şi va constitui o sursă de inspiraţie şi în rezolvarea anumitor probleme de biomecanică.

Scanned with OKEN Scanner

Cantitatea de mucopolizaharide, în diferitele tipuri de ţesut conjunctiv, variază în limite foarte largi, de la 0,5 la peste 20%. Prezenţa acestor substanţe a fost corelată în mod special cu structura şi funcţiile substanţei fundamentale, a matricelor cartilaginoasă şi osoasă, iar, pe un plan secundar, cu organizarea macromoleculară a fibrelor elastice şi colagene.

Cercetările din cursul ultimului deceniu au demonstrat că mucopolizaharidele există în ţesutul conjunctiv sub formă de complexe mucoprotidice, alcătuind cu proteinele nu numai unităţi chimice, ci şi funcţionale.

STRUCTURĂ

Acidul hialuronic

Acidul hialuronic este un polimer liniar, neramificat, cu greutate moleculară mare, alcătuit din cantităţi echimoleculare de acid D-glucuronic şi de N-acetil-glucozamină, substanţe ce formează unitatea dizaharidică : 2-acetamido-2-dezoxi-3-0 (beta-D-glucopiranuronozil) — D-glucoză. Din repetarea acestei unităţi ia naştere polimerul, a cărui stabilitate structurală este asigurată prin alternanţa legăturilor beta-1.3-glucuronidice şi beta-1.4-glucozaminidice. Acidul glucuronic pare a fi legat prin C_1 cu C_3 al acetilglucozaminei, în timp ce C_1 din glucozamină este legat cu C_4 al acidului glucuronic din dizaharidul adiacent, aşa cum se vede în *fig. 27*. Gradul de polimerizare variază după tipul ţesutului conjunctiv, stadiul evoluţiei ontogenetice, condiţiile fiziologice locale etc., greutatea moleculară fiind de $2 - 5 \times 10^5$ în umoarea vitroasă, $1 - 10 \times 10^6$ în cordonul ombilical, între $3{,}5 \times 10^4$ şi 6×10^4 în peretele aortei [121].

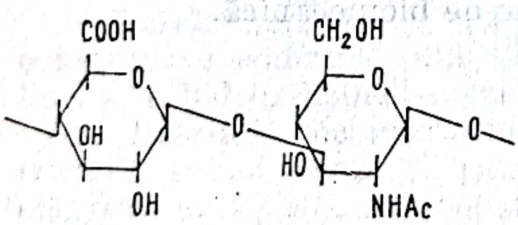


Fig. 27. Dizaharidul repetabil al acidului hialuronic.

Unitatea regulat repetabilă are o lungime de 11,98 Å, ceea ce ar sugera că distanţa între două grupări carboxilice adiacente este de aproxi-

Scanned with OKEN Scanner

mativ 10 Å, justificînd absenţa metacromaziei sau chiar slaba coloraţie bazofilică a anumitor substanţe fundamentale [1118].

Acidul hialuronic se comportă în soluţii ca o moleculă difuză, volumul ocupat depăşind pe cel justificat prin greutatea sa moleculară. Drept urmare, trei macromolecule de colagen, avînd un volum apropiat de cel al unei macromolecule de acid hialuronic, ocupă un spaţiu de aproximativ 25 000 de ori mai redus decît cel necesitat de macromolecula de mucopolizaharid [975]. Capacitatea acidului hialuronic de a se comporta ca o moleculă difuză a fost corelată cu rolul de filtru selectiv, exercitat în substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv. *In vitro*, în concentraţii variind de la 0,01 la 0,1%, acidul hialuronic difuzează uniform în soluţie şi, cu cît concentraţia creşte, are tendinţa de aglomerare în reţele tridimensionale ce se interpătrund. Cînd cantitatea sa se apropie de 1%, considerată cea mai frecvent întîlnită în ţesuturi, reţelele sînt net constituite, apărînd la microscopul electronic sub formă de filamente cu o lungime de mai multe mii de Å şi cu un diametru de 30 — 50 Å [123]. Ochiurile acestor reţele sînt cu atît mai mici, cu cît concentraţia şi gradul de polimerizare a mucopolizaharidului sînt mai ridicate, rezultînd o „excludere" din soluţie a celorlalte tipuri de macromolecule.

Un factor important în menţinerea rigidităţii reţelelor tridimensionale îl reprezintă gruparea carboxilică a acidului glucuronic, care determină un anumit grad de repulsie reciprocă între unităţile dizaharidice adiacente. Dacă gruparea carboxilică este eliminată, sau sarcina negativă liberă pe care o poartă este neutralizată, rigiditatea reţelelor tridimensionale diminuă, lanţurile polimerului tind să devină semispiralate şi se reduce gradul de vîscozitate a soluţiei de acid hialuronic [52]. Un alt factor de stabilizare structurală (în afara legăturilor intra- şi intermoleculare şi a prezenţei sarcinilor electrice negative libere la suprafaţa macromoleculei) este reprezentat de legăturile cu proteinele. Cantitatea de proteine ar fi de aproximativ 2% din totalul complexului macromolecular, iar studiile cu iod radioactiv au sugerat un turnover similar pentru ambele componente ale complexului mucoprotidic [936]. Nu s-a putut preciza tipul legăturilor acid hialuronic-proteine, fiind luate în consideraţie atît atracţii electropolare, cît şi conectări de tip-O-glucozidice, unind serina şi treonina de mucopolizaharid, prin intermediul unor glucide neutre.

Condroitin-sulfaţii

Condroitin-sulfatul A sau condroitin-4-sulfatul. Acest mucopolizaharid, considerat drept constituentul major al matricei cartilajului şi osului, prezintă următoarele particularităţi de structură: *a*) dizaharid repetabil, alcătuit din unităţi de acid glucuronic şi de N-acetilgalactozamină; *b*) grupare sulfat ataşată prin legătură ester (O-sulfat) la C_4 al fiecărei molecule de acetilgalactozamină; *c*) legături alternante 1.4-

galactozaminidice şi 1.3-glucuronidice; *d*) configuraţie beta a legăturilor dînd caracterul levogir al macromoleculei.

Considerînd că unitatea monomerică are o lungime de 10,8 Å, distanţa dintre două funcţii acide este de aproximativ 5 Å, condiţie sterică favorabilă apariţiei metacromaziei [1134]. Această unitate dizaharidică are următoarea formulă: beta 1→3 glucuronido-N-acetilgalactozamină-4-sulfat (sau N-acetilcondrozină sulfat), schematizată în *fig. 28.*

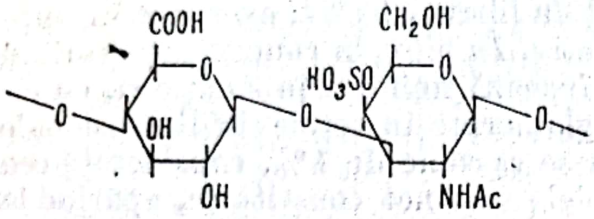


Fig. 28. Dizaharidul repetabil al condroitin-sulfatului A.

Existenţa a doi radicali acizi, sulfat şi carboxil, pentru fiecare unitate dizaharidică, explică proprietăţile de polielectrolit anionic ale condroitin-sulfatului, reflectate atît pe plan biologic, cît şi al reactivităţii histochimice. Menţionăm, pe plan biologic: rolul de răşină organică schimbătoare de cationi, atît de important în menţinerea homeostaziei matricei cartilajului şi în mineralizarea matricei osoase; comportarea ca moleculă „difuză" în substanţa fundamentală; influenţarea capacităţilor visco-elastice ale fibrelor.

Ca şi acidul hialuronic, condroitin-sulfatul se găseşte în organism în asociere cu proteinele, la nivelul cartilajului izolîndu-se un complex mucoprotidic particular, denumit „condromucoproteină" [974], cu un conţinut mucopolizaharidic de 75,85% [715]. Au mai fost izolate complexe macromoleculare înglobînd şi keratosulfat [422], precum şi acid sialic [24]. Se sugerează că mucoproteina ar avea fie o structură ramificată (alcătuită dintr-un nucleu protidic unit prin legături covalente cu lanţurile laterale mucopolizaharidice), fie o structură liniară, rezultînd din înlănţuirea a 20 — 100 de macromolecule de condroitin-sulfat, prin intermediul unor „punţi" polipeptidice. Scăderea rapidă a vîscozităţii soluţiilor de condromucoproteină după digestia fracţiei proteice prin papaină, în comparaţie cu scăderea lentă obţinută după digestie cu hialuronidază testiculară, ar pleda pentru ipoteza configuraţiei în lanţuri ramificate [201].

În lucrări publicate cu acest subiect, greutatea moleculară a condroitin-sulfatului A variază între 240 000 şi 4 000 000, numărul lanţurilor fracţiei glucidice a complexului mucoprotidic între 8 şi 62, lungimea lor între 600 şi 3 500 Å, rezultatele fiind influenţate de metodologia utilizată şi de sursa substratului investigat.

În ceea ce priveşte componenta proteică a condromucoproteinei, se sugerează că ar fi vorba de o glicoproteină[684], bogată în lizină [293].

Hidroliza blîndă a condromucoproteinei în soluţii alcaline, determină degradarea serinei, probabil ca urmare a unui proces de beta-eliminare, concomitent cu o separare a fracţiilor mucopolizaharidice şi proteice.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste rezultate au sugerat participarea grupării hidroxil a serinei în procesul de interconectare a complexului mucoprotidic [260, 910]. Analize ulterioare au evidenţiat că regiunea de cuplare mucopolizaharido-proteică este constituită din acid glucuronic-galactoză-galactoză-xiloză-serină [619]. Acidul glucuronic ar fi ataşat de galactoză prin legături de tip 1.3 sau 1.4 glucuronidice, în timp ce xiloza se uneşte glicozidic cu gruparea hidroxil a serinei. În ceea ce priveşte poziţia serinei în macromoleculă, există două ipoteze: fie constituie punctul de ramificaţie a lanţului central peptidic, fie este situată pe o ramură peptidică scurtă de care sînt ataşate lanţurile glucidice [487].

Condroitin-sulfatul C sau condroitin-6-sulfatul. Particularitatea structurală este dată de prezenţa grupării sulfat la nivelul C_6, dizaharidul repetabil fiind: beta-1→ 3– glucuronido-N-acetil-galactozamină-6-sulfat (*fig. 29*). Are aceleaşi proprietăţi biologice şi reactivităţi histochimice ca şi condroitin-sulfatul A, fiind semnalată de asemenea, asocierea lui cu proteinele. În mod particular, în anumite complexe mucoprotidice a fost evidenţiat şi keratosulfatul, mai ales în cartilajul costal al bătrînilor şi în nucleul pulpos al discului intervertebral [29].

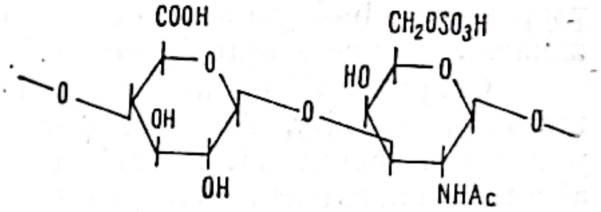


Fig. 29. Dizaharidul repetabil al condroitin-sulfatului C.

Condroitin-sulfatul B sau dermatan-sulfatul. Este unul dintre constituienţii principali ai ţesutului conjunctiv dermic, justificînd astfel denumirea de dermatan-sulfat [532]. Se găseşte, de asemenea, în tendoane, valvule cardiace şi peretele vascular. Evidenţierea unei slabe capacităţi anticoagulante i-a adus denumirea de beta-heparină, extrem de rar utilizată în literatura de specialitate.

Macromolecula pare să aibă o constituţie hibridă; fracţia hexozaminică, asemănătoare celei a condroitin-sulfatului A, este N-acetilgalactozamina sufatată la C_4; în schimb, fracţia acidă este reprezentată fie de acidul D-glucuronic, fie de acidul L-iduronic, propunîndu-se următoarea structură pentru tetrazaharidele izolate [346, 347]:

acid glucuronic → N-acetil galactozamină → acid iduronic → N-acetil-galactozamină
SO_4 SO_4

Monozele sînt unite prin legături 1→3 iduronice (sau glucuronice) şi 1→4 galactozaminidice. Configuraţia lor beta dă macromoleculei caracterul levogir. În *fig. 30* este prezentat dizaharidul repetabil al condroitin-sulfa-

tului B, avînd următoarea formulă; beta- 1→3 iduronido-N-acetil-galactozamină-4-sulfat.

Diferenţele de structură chimică, şi în special prezenţa acidului iduronic, ar explica deosebirile în activitatea biologică a acestui tip de

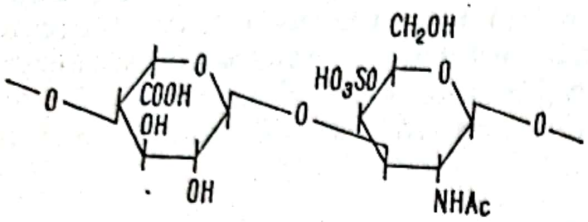


Fig. 30. Dizaharidul repetabil al condroitin-sulfatului B.

condroitin-sulfat, ca şi paternul său particular histochimic, caracterizat prin rezistenţa la digestia cu hialuronidază testiculară.

Heparina

Cantitatea importantă de grupări sulfat (aproximativ 40%) constituie principala particularitate structurală a heparinei. Majoritatea preparatelor biologic active conţin cinci rezidii sulfat pentru fiecare tetrazaharid, în unele eşantioane evidenţiindu-se 6,46 rezidii [295].

Grupele sulfat sînt ataşate fie prin intermediul unei legături sulfaminice (N-sulfat), fie ester (0-sulfat). Prezenţa N-sulfatului pare a fi particulară heparinei, întrucît nu a mai fost evidenţiată pînă acum la alte mucopolizaharide. Grupele sulfat sînt localizate la C_2 în acidul uronic (50% din rezidiile uronice fiind sulfatate) şi la C_6 în glucozamină [340]. Radicalii sulfamină pot fi uşor îndepărtaţi cu ajutorul hidrolizei acide, în timp ce rezidiile ester-sulfat sînt degradate de soluţii alcaline. Desfacerea tuturor legăturilor sulfaminice şi ester-sulfat duce la apariţia unui polizaharid desulfatat total, lipsit de activitate anticoagulantă.

Macromolecula de heparină se mai deosebeşte de cea a celorlalte mucopolizaharide acide şi prin configuraţia alfa a legăturilor glucozidice, care conferă heparinei caracterul dextrogir [486, 523]. Această particularitate în dispoziţia sterică a legăturilor ar explica şi forma helicoidală a lanţului macromolecular al heparinei [1038]; de asemenea ar explica şi rezistenţa heparinei faţă de digestia cu hialuronidaze, cu beta-glucuronidază şi cu beta-glucozaminidază. Legăturile menţionate sînt de tipul 1.4 — glucozaminidic, alternînd cu legături uronidice, a căror configuraţie principală este 1.4 [257] sau 1.6 [216]. Subliniem că legătura în configuraţia 1.4 este particulară conectărilor de tip uronidic ale heparinei, în toate celelalte mucopolizaharide acide cunoscute pînă acum găsindu-se legături 1.3. În *fig.31* schematizăm tetrazaharidul repetabil din lanţul polimerizat al heparinei.

Ca şi celelalte mucopolizaharide, heparina se găseşte în stare nativă sub formă de complex mucoprotidic, cu acelaşi tip de legătură, evidenţiat şi la condroitin-sulfaţi. Analizele efectuate în scopul unei cunoaşteri cît mai

Scanned with OKEN Scanner

amănunţite a structurii chimice a zonei de legătură heparină-proteină au reuşit să demonstreze următoarea secvenţă a substanţelor constitutive [649]: acid iduronic → acetilglucozamină → acid glucuronic → galactoză → xiloză →serină→polipeptid (*fig. 32*). Serina pare a fi conectată de xiloză prin intermediul grupării sale hidroxil.

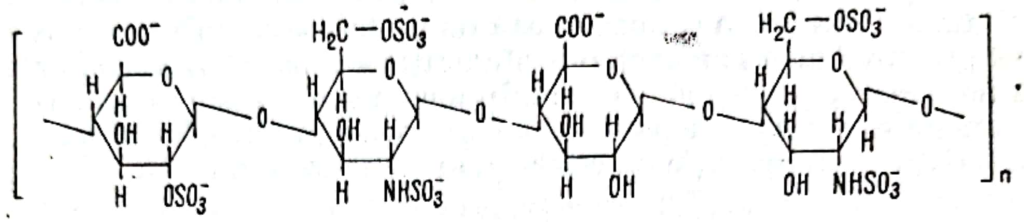


Fig. 31. Tetrazaharidul repetabil al heparinei.

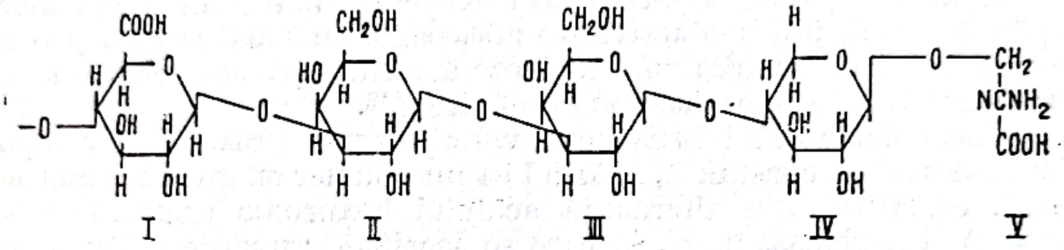


Fig. 32. Regiunea de interconectare heparină-proteină, incluzînd următoarele unităţi: I) acid glucuronic; II) galactoză; III) galactoză; IV) xiloză; V) serină.

Zona de legătură cu proteina ar fi singura regiune din complexul macromolecular unde glucozamina există sub formă acetilată, în restul lanţurilor heparinice fiind neacetilată. Aceste observaţii au sugerat ipoteza că biosinteza polimerului ar avea loc plecîndu-se de la un precursor alcătuit din alternanţa N-acetilglucozaminei şi acidului uronic [1000]. Ulterior, gruparea N-acetil este înlocuită prin N-sulfat, dar această înlocuire pare a fi incompletă, în regiunea de legătură cu proteina enzima care produce dezacetilarea fiind, probabil, blocată steric.

Greutatea moleculară a heparinei variază în limite destul de mari, dar toţi autorii sînt de acord că ea are un grad mai redus de polimerizare în comparaţie cu acidul hialuronic şi condroitin — sulfaţii. Valorile între 7 600 şi 20 000 sînt cel mai des întîlnite în literatura de specialitate [157].

Gradul ridicat de sulfatare a heparinei, explică importanta încărcare cu sarcini electrice negative libere, permiţîndu-i să acţioneze ca o răşină schimbătoare de cationi.

Prin intermediul grupelor acide libere, heparina poate lega grupele amino ale proteinelor şi, mai ales, ale anumitor amine biologice de tipul histaminei şi serotoninei. S-a determinat că 1 mol de heparină conectează 22 moli de histamină [1177]. Desulfatarea heparinei este urmată atît de pierderea capacităţii anticoagulante, cît şi a celei de legare a histaminei. Tot datorită grupelor sulfat atît de numeroase, se atribuie heparinei acţiuni inhi-

bante asupra anumitor enzime (tripsină, pepsină, hialuronidază, ribonuclează etc.), rezultînd din procese reversibile, bazate pe atracţii electropolare; aceiaşi capacitate de legare a grupărilor amino ar putea explica şi anumite efecte antitoxice exercitate de mucopolizaharid.

Prezenţa acidului iduronic în macromolecula heparinei, a heparitin-sulfatului şi a condroitin-sulfatului B a fost corelată cu capacitatea anticoagulantă şi antilipemică, exercitată de toate aceste substanţe. S-a sugerat că gruparea acidă ar avea o configuraţie sterică nefavorabilă reacţiilor intermoleculare, potenţînd, în schimb, fenomenele de suprafaţă. De aceea, substanţele din grupul heparinei ar avea o „suprafaţă funcţională" mult mai activă, în comparaţie cu celelalte mucopolizaharide [713].

Heparitin-sulfatul

Se deosebeşte de heparină prin existenţa unui număr mai mare de grupări N-acetil, printr-o activitate anticoagulantă mai redusă şi o cantitate mai mică de grupări sulfat. Această ultimă particularitate a stat la baza denumirii de heparină monosulfatată [538].

Mucopolizaharidul izolat din variate surse prezintă o compoziţie chimică destul de constantă, apărînd ca un polimer cu greutate moleculară redusă, constituit din alternanţa acidului hexuronic (glucuronic şi/sau iduronic) şi a glucozaminei, la care se asociază grupările sulfat şi acetil. Cantitatea de sulfat total a fost găsită în jur de 16%, grupările sulfat fiind, în parte, legate de radicalii amino (N-sulfat) şi, în parte, fixate prin legături ester (0-sulfat). Formele cele mai sulfatate conţin, aproximativ, două rezidii sulfat pe dizaharid. Electroforeza pe hîrtie indică prezenţa, în aceiaşi moleculă, atît a radicalilor sulfamină (N-sulfat), cît şi a celor acetilamină (N-acetil). Proporţia lor în cantităţi aproximativ egale sugerează că heparitin-sulfatul este o macromoleculă hibridă, rezultînd din condensarea a două tipuri de unităţi dizaharidice: acid glucuronic sau iduronic (1.3) — N-acetilglucozamină şi acid glucuronic sau iduronic (1.3) — glucozamină-O-sulfat-N-sulfat [656]. Datele acumulate pînă acum conturează heparitin-sulfatul ca un polimer ramificat, avînd dizaharidele acetilate şi nesulfatate situate în zona centrală a macromoleculei, în timp ce grupările N-sulfat şi O-sulfat ar fi situate în ramificaţiile exterioare.

Mucopolizaharidul există în ţesuturi sub formă de complexe cu proteinele, complexul în întregime avînd, în aortă de exemplu, o greutate moleculară de 24 000 — 29 000 [527]. Zona de legătură conţine aceiaşi secvenţă a galactozei, xilozei şi serinei.

Keratosulfatul

Diferă de celelalte mucopolizaharide sulfatate prin prezenţa unui zahăr neutru, galactoza, ce înlocuieşte acidul uronic. Pe baza unor studii recente a fost definit ca un mucopolizaharid alcătuit din proporţii echimo-

Scanned with OKEN Scanner

leculare de D-galactoză şi N-acetil-D-glucozamină şi din cantităţi variabile de sulfat, L-fucoză, acid sialic şi N-acetil-D-galactozamină [126]. Acest mod de asociere a monozaharidelor este, pînă la un anumit punct, similar cu cel întîlnit în substanţe de grup sanguin, ceea ce explică şi sensibilitatea comună a keratosulfatului şi a substanţelor de grup sanguin la digestia cu beta-glucozaminidaze şi beta-galactozidaze; constituţia chimică apropiată ar putea explica apariţia de reacţii imunologice încrucişate, între keratosulfatul desulfatat şi substanţele de grup sanguin [914].

Cu toată absenţa acidului uronic, keratosulfatul are caracter destul de puternic acid, datorită prezenţei grupărilor sulfat fixate la C_6 al glucozaminei. În anumite eşantioane, grupele sulfat au apărut în proporţie de 75% la C_6 al glucozaminei şi în proporţie de 25% la C_6 al galactozei [125].

Analizele fizico-chimice şi, în special, investigaţii bazate pe metilare au precizat natura legăturilor între monozaharidele constitutive, caracterizîndu-le ca beta-D-(1.4)-galactozidice şi beta-D-(1.3)-glucozaminidice [482]. Monomerii care se repetă de-a lungul lanţului polimeric sînt reprezentaţi de dizaharidul: (1.3)-beta-D-galactopiranozil-(1.4)-2-acetamido-2-dezoxi-beta-D-glucopiranozil-6-O-sulfat (*fig. 33*).

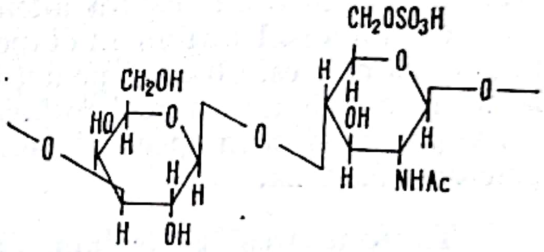


Fig. 33. Dizaharidul repetabil al keratosulfatului.

Greutatea moleculară în eşantioanele extrase din ţesut cornean a variat între 4×10^3 şi $1{,}9 \times 10^4$ [634]. S-au izolat şi agregate „hibride", alcătuite din lanţuri de keratosulfat şi de condroitin-sulfaţi A sau/ şi C, ambele unite cu fracţii protidice [887], întregul complex macromolecular comportîndu-se ca o unitate chimică şi funcţională.

Spre deosebire de alte tipuri de mucopolizaharide, legăturile keratosulfatului cu proteinele par să fie mai variate, evidenţiindu-se atît conectări de tip O-glicozil, interesînd hidroxilii serinei şi treoninei, cît şi de tip N-glicozil, interesînd grupările amidice ale asparaginei şi glutaminei. Legăturile N-glicozil sînt extrem de numeroase în materialul extras din cornee, pe cînd cele O-glicozil domină în keratosulfatul din cartilaj.

Variabilitatea tipurilor de conectare explică de ce legăturile keratosulfat — proteine sînt mai rezistente la degradare chimică, decît legăturile condroitin sulfaţi — proteine. În plus, lanţurile de keratosulfat ar fi extrem de apropiate unul de altul, împiedicînd pătrunderea diferitelor tipuri de enzime, iar legăturile care se stabilesc între lanţurile polipeptidice însăşi, ar crea o rigiditate a macromoleculei, reflectată prin turnoverul său extrem de redus, la limita inerţiei metabolice. În lumina acestor

Scanned with OKEN Scanner

considerații putem înțelege mai bine creșterea cantitativă a keratosulfatului o dată cu apariția senescenței, mai ales în teritorii lipsite de vascularizație sau slab irigate, cum sînt cartilajul, discul intervertebral sau corneea.

SINTEZĂ

Datele privind structura mucopolizaharidelor au evidențiat următoarele substanțe a căror sinteză și mod de agregare trebuie luat în considerare în studiul biogenezei acestor macromolecule : *hexoze* (glucoză, galactoză, manoză), *hexozamine* (glucozamină, galactozamină, manozamină), *acizi uronici* (acid glucuronic, acid iduronic), *acid sialic* și *fucoză*.

Pentru a intra în ciclul etapelor de sinteză a mucopolizaharidelor, monozaharidele trebuie să sufere următoarele transformări :

Fosforilare. Există două căi principale prin intermediul cărora iau naștere derivații fosforilați. 1) Prima este bazată pe acțiunea hexokinazei (EC. 2. 7.1.1) care catalizează transferul grupării fosfat, de la adenozin trifosfat la glucoză : rezultă adenozindifosfat și glucoză-6-fosfat, derivat aproape universal întîlnit în etapele inițiale ale metabolismului glucidelor. 2) A doua cale este bazată pe acțiunea fosforilazei (EC.2.4.1.1) care catalizează formarea de esteri 1-fosfat, în prezența fosfatului mineral. Acești derivați participă în special la sinteza acizilor uronici și la epimerizarea glucoză-galactoză.

Transmutarea radicalului fosfat. În cadrul acestui proces, catalizat de fosfoglucomutază (EC. 2.7.5.1), glucozo-6-fosfatul suferă o transformare reversibilă în glucozo-1-fosfat, formă sub care participă la sinteza acizilor glucuronici. Transmutări similare au ca substrat fosfații acetilglucozaminei, manozei și galactozei.

Incorporare în complexe nucleotidice. Nucleotizii, molecule posedînd legături fosfat bogate în energie, se cuplează cu glucidele sub formă de complexe zaharuri-nucleotide, cuplare din care rezultă o „activare" a monozaharidelor. Acestea devin capabile să sufere interconversiuni și să interacționeze rapid. Formarea complexului glucid-nucleotid este catalizată de nucleotidil-transferaze sau pirofosforilaze (EC.2.7.7). Majoritatea complexelor glucid-nucleotid, izolate pînă acum, apar ca derivați ai uridin-trifosfatului.

Epimerizare. Proces caracterizat prin inversiunea configurației carbonului asimetric, ca urmare probabilă a unei oxidoreduceri a radicalilor atașați de acest carbon asimetric. Intermediarul ceto, a cărui existență este doar presupusă, ar fi intim legat de enzima ce catalizează procesul. Pentru ca epimerizarea să aibă loc, epimerazele necesită cantități adecvate de nicotinamidă-adenin-dinucleotid, ca acceptor de hidrogen.

Scanned with OKEN Scanner

Transformare aldo-cetoză. Conversiunea are loc sub acţiunea izomerazelor sau oxidoreductazelor intracelulare (EC.5.3.1), cea mai bine cunoscută fiind fosfoglucoizomeraza (EC.5.3.1.9) care catalizează conversiunea glucozo-6-fosfatului, în fructozo-6-fosfat, etapă iniţială în sinteza glucozaminei.

Aminare: formarea hexozaminelor. Hexozaminele sînt derivate ale hexozelor, avînd o grupare hidroxil înlocuită de un radical amină. Procesul comportă două etape principale: *a*) „activarea" hexozelor, sub formă de derivaţi 6-fosfat, activare efectuată fie prin intervenţia unei hexokinaze în prezenţa adenozin-trifosfatului, fie prin acţiunea unei fosfohexomutaze asupra hexozelor-1-fosfat; *b*) aminarea hexozelor fosfatate, transaminarea efectuîndu-se prin cataliza transaminazelor (EC.2.6.1); glutamina joacă rolul de donor, fiind convertită în glutamat.

Acetilare: formarea acetilhexozaminelor. Acetilarea constă din transferul rezidiilor acetil ale acetil-coenzimei A la grupările amino ale hexozaminei-6-fosfat, procesul fiind catalizat de transacetilaze specifice (EC.2.3.1).

Oxidare: formarea acizilor uronici. Procesul este caracterizat prin transformare, în funcţie acidă, a funcţiei alcool primare de la C_6, apărînd o grupare carboxil. Formarea acidului iduronic implică şi o epimerizare la C_5. Epimeraza acidului uridin-difosfo-glucuronic a fost evidenţiată în variate tipuri de celule conjunctive, ca şi în membranele bazale sarcolemice [272, 273].

Reducere: sinteza fucozei. Asupra acestor date vom reveni mai pe larg în subcapitolul privind biogeneza glicoproteinelor. Menţionăm numai că reducerea are loc la C_6, producîndu-se şi o inversiune în configuraţia atomilor de la C_2, C_3 şi C_5 ai glucozei, molecula inductoare.

A doua etapă în biogeneza mucopolizaharidelor include formarea dizaharidelor, oligozaharidelor şi, însfîrşit, a polizaharidelor cu participarea următorilor factori:

Donorii. Transportă rezidiile glucidice. Monozele libere nu participă la formarea mucopolizaharidelor. Ele trebuiesc „activate" prin cuplarea cu nucleotizi, derivatul nucleotidic al acestor monoze apărînd: *a*) fie direct, în cursul sintezei substanţei însăşi (de exemplu, acidul uridin-difosfo-glucuronic, rezultă din oxidarea glucozei deja încorporate în complexul nucleotidic); *b*) fie ca un produs de reacţie ulterioară, catalizat de pirofosforilaze specifice, determinînd apariţia acelei forme „active", adecvată formării biopolimerilor. S-au izolat şi identificat numeroşi nucleotizi ce participă la biogeneza mucopolizaharidelor.

Pentru a fi incluse în lanţurile polimerilor, monozele activate sînt ulterior liberate din complexul nucleotidic, sub acţiunea unor pirofosfataze specifice. Aceste enzime pun simultan în libertate uridin-monofosfatul

Scanned with OKEN Scanner

şi fosfatul anorganic, monozaharidul „activat" fiind ataşat reziduului terminal al acceptorului.

Acceptorii.. Sînt reprezentaţi fie de un monozaharid care, ca şi donorul, este sub formă de derivat nucleotidic, fie de un lanţ oligo sau polizaharidic, care se alungeşte pe măsură ce se adaugă un nou rezidiu glucidic la capătul său reducător. Mucopolizaharidele rezultă din asocierea tipurilor diferite de monozaharide, apărînd sub forma unor heteropolizaharide, ca urmare : a) fie a unei anexări de zaharuri diferite, în fiecare etapă încorporîndu-se în macromoleculă un singur tip de monozaharid ; *b*) fie a unei anexări de grupe de monozaharide, unite sub formă dizaharidică sau oligozaharidică, realizînd intermediari preformaţi, a căror repetare regulată asigură polimerizarea. Pentru anumite substanţe, polimerizarea necesită prezenţa unui „primer" respectiv a unor oligozaharide capabile de a induce polimerizarea. Ele ar preexista în celulele conjunctive, constituind suportul pe care se adaugă monozaharidele „activate". Acest inductor de model (nucleu de creştere etc), este extrem de important în sinteza glicogenului existînd dovezi mai puţin convingătoare în ceea ce priveşte polimerizarea mucopolizaharidelor.

Enzimele de transfer. Condensarea monozelor în polimeri cu greutate moleculară ridicată necesită constituirea de legături glucozidice, ce apar ca urmare a pierderii unei molecule de apă şi a conectării prin punţi oxidice. Aceste legături se stabilesc la nivelul grupării hidroxilului semiacetalic (poziţia 1, în aldoze şi 2, în cetoze) şi a unei alte grupări hidroxil fie semiacetalică, fie primară sau secundară. Monozele liberate din donorii respectivi sînt transferate pe lanţurile acceptorului graţie activităţii transglicozilazelor sau glucoziltransferazelor (EC.2.4). Specificitatea transglicozilazelor se manifestă faţă de receptor, de glucidul transferat şi de nucleotidul transportor.

Activatorii. S-a constatat că biogeneza acidului hialuronic este potenţată de prezenţa acetilglucozaminei-6-fosfat, existînd astfel de substanţe care stimulează biogeneza polizaharidelor, fără a fi încorporate în produsul final de reacţie, aşa cum se întîmplă cu „primerii". Rolul acestor activatori este de a interveni ca mecanism de reglare a catalizei exercitată de enzimele sintetizante, stabilizînd aceste enzime în configuraţia sterică cea mai adecvată.

Un proces particular legat de faza finală a biogenezei mucopolizaharidelor este **încorporarea radicalilor sulfat.**

Oxidarea şi clivarea tiolilor, în special a acizilor tioaminaţi, pare să constituie principala sursă de grupări sulfat, numeroase investigaţii în acest domeniu evidenţiind rolul cisteinei în acest proces. Introducerea unei grupări sulfat într-o macromoleculă de mucopolizaharid, realizînd fie esteri ca în cazul condroitin-sulfaţilor, fie compuşi sulfaminici, ca în

Scanned with OKEN Scanner

cazul heparinei, implică „activarea" grupării sulfat sub formă de nucleotid-adenozin-3′-fosfat-5′-fosfosulfat (PAPS), a cărui structură este prezentată în *fig. 34*. Acesta apare în cursul a două etape principale [902] : 1) O reacţie între sulfat şi adenozin-trifosfat, catalizată de adenozin-trifosfat : sulfat-adenililtransferază (EC. 2. 7. 7. 4) ; rezultă adenozin-5′-fosfosulfatul

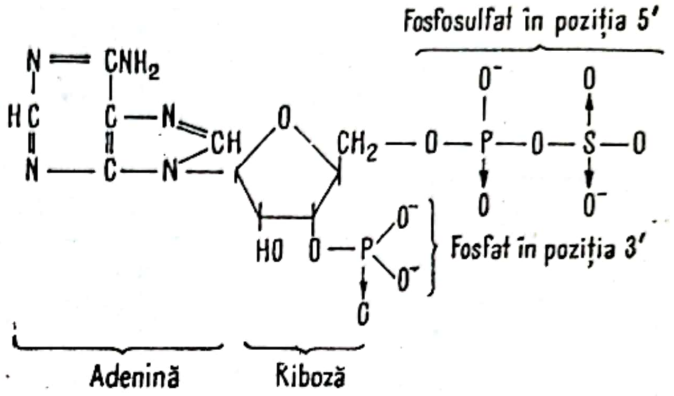


Fig. 34. Structura sulfatului „activ" (adenozin-3′-fosfat-5′-fosfosulfat sau PAPS).

(APS) şi pirofosfatul. Efectuarea reacţiei în sensul sintezei necesită prezenţa unei pirofosfataze (EC. 3. 6. 1. 1) ce hidrolizează pirofosfatul, în timp ce absenţa enzimei duce la acumularea substratului şi deplasarea echilibrului reacţiei în direcţie inversă, rezultînd degradarea adenozin-fosfosulfatului. Absenţa sulfatului „activ" ar putea deci fi explicată, în anumite cazuri, prin absenţa precursorului său. 2) A doua etapă include fosforilarea adenozin-5′-fosfosulfatului, prin intermediul unei noi molecule de adenozin-trifosfat şi transformarea sa în PAPS, catalizată de o adenozin-5-fosfosulfokinază sau adenozin-trifosfat-adenililsulfat-3′ fosfotransferază.

Două posibilităţi sînt de luat în consideraţie, în ceea ce priveşte mecanismul de transfer : *a*) radicalul sulfat este încorporat în derivatul uridin nucleotidic al monozaharidelor şi apoi ataşat, sub această formă, la lanţul acceptorului ; rezultă un proces simultan de polimerizare şi sulfatare a mucopolizaharidului ; *b*) esterul sulfat este transferat direct din fosfo-adenozin- fosfosulfat pe lanţul acceptor, realizîndu-se doar o creştere progresivă a gradului de sulfatare a mucopolizaharidului. S-a sugerat că încorporarea de grupări sulfat necesită fixarea acestei grupări la capătul nereducător al lanţului glucidic pe cale de polimerizare [1042] şi că oligozaharidele de tipul tri-, penta sau septazaharidelor sînt mai apte să se sulfateze decît cele de tipul tetra-, hexa- sau octozaharidelor. Transferul sulfatului este efectuat de către sulfotransferaze (sulfokinaze EC. 2. 8. 2), cel mai frecvent prin formarea unei legături ester între radicalul sulfat şi o grupare hidroxil a acceptorului. La heparină apar şi legături sulfaminice, probabil ca o consecinţă fie a unei reacţii de schimb între sulfat şi radicalul N-acetil, fie a unei fixări a sulfatului pe o grupare amină primară, liberă. S-au identificat în acest sens enzime specifice pentru fiecare tip de mucopolizaharid, sugerînd că sulfatul este introdus în lanţuri polizaharidice deja constituite, care acţionează ca acceptori. În lumina acestor date, condroitinul, pre-

Scanned with OKEN Scanner

cursorul condroitin-sulfaţilor, apare ca un „primer" ce va suferi ulterior procesul de sulfatare.

O ultimă etapă în biogeneza mucopolizaharidelor ar fi *constituirea de complexe moleculare cu proteinele*. Date în legătură cu modul de formare

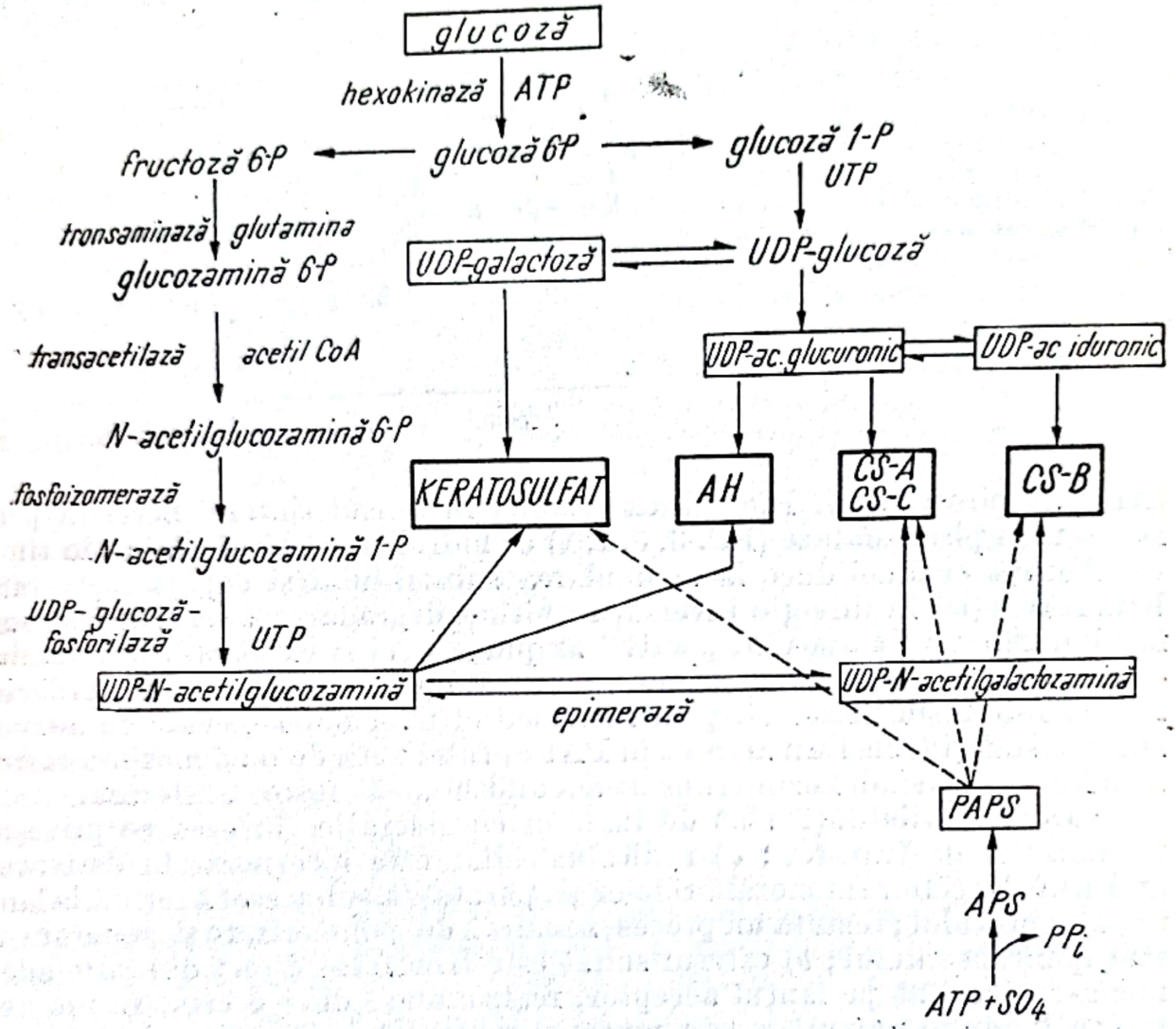


Fig. 35. Sinteza mucopolizaharidelor. Etapele principale.

a conexiunilor dintre fracţiile glucidice şi protidice la fiecare mucopolizaharid în parte, au fost prezentate în paginile anterioare şi nu mai revenim asupra lor.

Principalele etape ale sintezei mucopolizaharidelor sînt prezentate în *fig. 35*.

Aspecte celulare ale sintezei mucopolizaharidelor

Fibroblastul. Intensitatea procesului de elaborare a mucopolizaharidelor nu apare egală la fibroblaştii prelevaţi din diferite zone de ţesut

Scanned with OKEN Scanner

conjunctiv, fiind mai mare la celulele de origină peritoneală, în comparaţie cu cele din derm sau sinovială [197].

Din cantitatea de 1,1 — 1,6 μmg de mucopolizaharide pe care o elaborează un fibroblast pe celulă şi pe oră, numai 5 — 10 % este sulfatată [764]. Urmărindu-se această sinteză cu ajutorul radioizotopilor, s-a constatat că primele acumulări apar în veziculele aparatului Golgi. Aspectul electronomicroscopic ar fi acela de mici granule cu un diametru de aproximativ 300 Å [671], care umplu treptat lumenele veziculelor, sugerînd că, la acest nivel, ar avea loc procesul de polimerizare. La microscopul optic s-a putut evidenţia apariţia în jurul nucleului a unui material bazofil, ce devine metacromatic după sulfatare şi care este digerat de betaglucuronidază. Ar fi vorba de un oligozaharid, un tri- sau un tetrazaharid carboxilat, nesulfatat şi neacetilat, avînd acidul glucuronic ca unitate terminală şi care ar reprezenta un precursor al acidului hialuronic sau al altor tipuri de mucopolizaharide [971]. Acelaşi tip de precursor a fost evidenţiat de noi în celulele din pereţii alveolelor pulmonare, după inhalaţii cronice prelungite cu fum de tutun sau bioxid de siliciu [682].

Condroblastul sintetizează în special condroitin-sulfatul A, asociat cu fracţia proteică cu care alcătuieşte un complex macromolecular mucoprotidic. Studii utilizînd variate tipuri de radioizotopi au permis să se demonstreze că mucopolizaharidul şi proteina sînt elaborate simultan în aceiaşi celulă [192], comportîndu-se ca o singură unitate, cu un timp de înjumătăţire variind între 7 — 16 zile, în funcţie de condiţiile experimentale şi etapa evoluţiei ontogenetice. Acest timp este de aproximativ 4 ori mai mare decît cel al acidului hialuronic, evaluat la 2 — 4 zile, ceea ce sugerează că ritmul elaborării de mucopolizaharid este mai intens în fibroblaşti, decît în condroblaşti, prin însăşi necesitatea înlocuirii mai rapide a macromoleculelor sintetizate. Ar exista anumite interacţiuni între fracţiile glucidice şi protidice în perioada formării lor în organitele celulare, acizii aminaţi fiind capabili să stimuleze încorporarea de sulf în mucopolizaharid [930], iar inhibarea sintezei acizilor aminaţi prin administrare de puromicină,a determinat o reducere a polimerizării şi a sulfatării mucopolizaharidului [487]. O observaţie, efectuată pe culturi de fibroblaşti, s-a repetat şi în culturile de condroblaşti, sugerînd că densitatea celulară, permiţînd interacţiuni de la un element la altul, constituie un factor esenţial de menţinere şi stimulare a unei capacităţi secretorii, genetic determinate [1]. În acest sens s-a putut demonstra că sinteza maximă de condroitin-sulfat pe celulă, evaluată la 20 μmg, apare numai cînd se atinge densitatea maximă a condroblaştilor în mediul de cultură [561]. Elaborarea condromucoproteinei se caracterizează electronomicroscopic printr-o dilatare importantă a canaliculelor reticulului endoplasmic, prin înmulţirea lor şi prin aşezarea în şiruri paralele. Dilataţiile pot atinge 0,5 μ diametru iar în lumenul lor se acumulează un material amorf, relativ dens la electroni, care se întinde pe distanţe foarte lungi [826]. Se mai constată formarea de interconexiuni între suprafeţele netede şi rugoase ale reticulului endoplasmic, creşterea numărului şi diametrului veziculelor aparatului Golgi, înmulţirea granulelor intracitoplasmatice, unele legate de membrane, altele libere. Într-un

Scanned with OKEN Scanner

stadiu ulterior, veziculele au tendinţa de a fuziona în cisterne largi, sacciforme, variatele aspecte de interconectare a acestor formaţiuni sugerînd o dinamică continuă a proceselor de sinteză, agregare şi stocaj [823], [824]. Eliminarea produşilor s-ar face în primul rînd, prin procese de pinocitoză „inversată", veziculele cu material de secreţie şi de agregare migrînd spre periferia celulei şi descărcîndu-şi la exterior conţinutul, în timp ce membrana lor se contopeşte cu aceea a celulei [389]. În *fig. 36* prezentăm o schematizare a acestui proces, efectuată pe baza a numeroase imagini electronomicroscopice, sintetizînd atît aspectele ultrastructurale ale trecerii de la celula mezenchimală la condrocit, cît şi cele ale eliminării extracelulare a produşilor de sinteză. Valoarea acestor observaţii a fost confirmată prin studii ulterioare cu izotopi marcaţi şi efectuarea de histoautoradiografii la microscopul electronic. Astfel, s-a putut demonstra că, după administrarea de radiosulfat, izotopul apare în decurs de 20 de minute în protoplasma condroblastului, avînd tendinţa de a se acumula în aparatul Golgi, considerat ca loc de polimerizare şi sulfatare a condroitin-sulfatului. Un aspect demonstrativ al acestei concentrări este prezentat în *fig. 37* [324].

Osteoblastul sintetizează, de asemenea, mucopolizaharide, în general de acelaşi tip cu condroblastul predominînd condroitin-sulfatul A. Ritmul de sinteză în matricea osoasă este însă mai moderat, existînd doar 0,5 % mucopolizaharide acide, în comparaţie cu 20,3% în matricea cartilajului. Diferenţa între intensitatea şi ritmul sintezei mucopolizaharidelor apare şi din analiza hexozaminei, în culturile de ţesuturi. După 48 de ore de cultură, mediul sintetic în care se dezvoltă osteoblaştii conţine numai 1,2 % hexozamină, în comparaţie cu 4,25 % în cultura de condroblaşti[526]. Aspectul ultrastructural al procesului de sinteză nu prezintă nimic particular, acelaşi aparat Golgi fiind incriminat ca loc de polimerizare şi sulfatare a mucopolizaharidului. Ritmul în care condroitin-sulfatul este eliminat din celulă, direcţia eliminării, precum şi alte particularităţi sterice ale mucopolizaharidului sintetizat de osteoblaşti, pot ajuta la înţelegerea unora dintre multiplele mecanisme care favorizează calcificarea oaselor sau mineralizarea fracturilor. S-a sugerat că grupele sulfat ale mucopolizaharidelor, dispuse la interval de aproximativ 5 Å într-o succesiune extrem de regulată, ar putea construi centre de reţinere a calciului şi de precipitare ulterioară sub formă de cristale de hidroxiapatită. Existenţa unui paralelism între concentraţia de grupe sulfat şi intensitatea mineralizării, ar pleda pentru această ipoteză [1020], [1021]. Concentrarea de grupe sulfat pare însă tranzitorie, jucînd doar rolul de nuclee de condensare, ce împiedică difuzarea liniară a electroliţilor. După ce s-au format primele cristale de hidroxiapatită, osteoblastul ar elimina enzime cu acţiune sulfatazică, degradînd grupele sulfat ale condroitin-sulfatului şi permiţînd, astfel, cristalelor de hidroxiapatită să fie legate covalent de către macromoleculele din fibrilele de colagen. În cursul vindecării fracturilor, există o perioadă de sinteză maximă a mucopolizaharidelor acide de către osteoblaşti (care precede, în mod obligator, începutul mineralizării [557]), evidenţiabilă mai ales prin administrare de radiosulfat. Dacă ritmul eliminării de mucopoli-

Scanned with OKEN Scanner

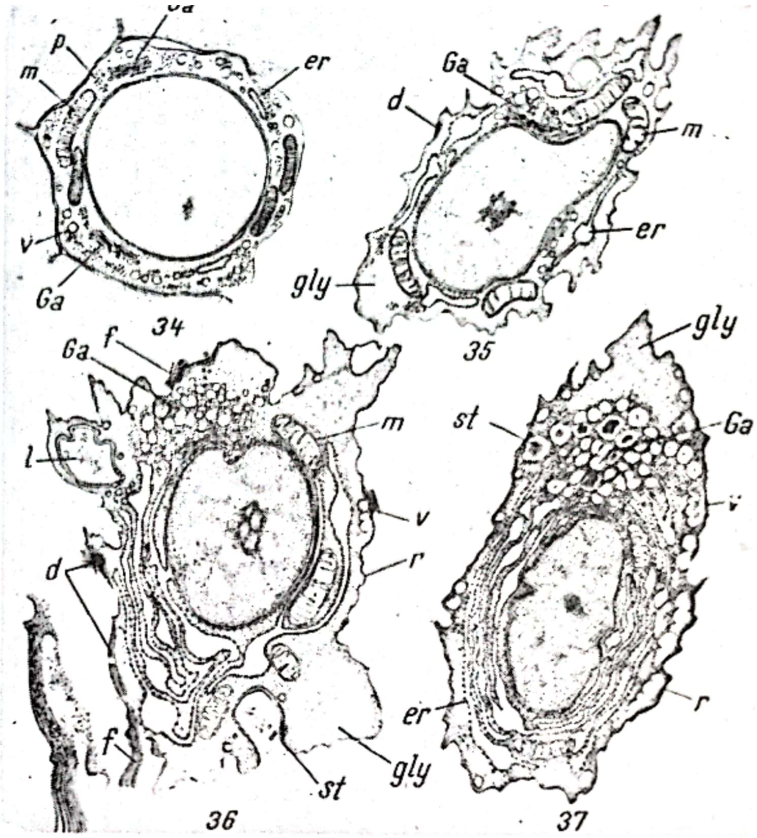


Fig. 36. Prezentare schematică a stadiilor de diferenţiere a celulei mezenchimale spre condroblast şi condrocit, cu ilustrarea organitelor celulare, dominante în fiecare stadiu.
Legendă: 34, precondroblast; 35, condroblast tînăr; 36, condroblast matur; 37 condrocit; *m*, mitocondrii; *er*, reticul endoplasmic; *Ga*, aparat Golgi; *v* vezicule; *g*, granule libere de ribonucleoproteine; *gly*, granule de glicogen; *d*, vacuole deplasate spre periferia celulei, cu un conţinut mai dens la electroni; *r*, vacuole a căror membrană tinde să se contopească cu aceea a celulei; *st*, aspect de pinocitoză inversată, cu eliminarea conţinutului veziculelor la exterior; *f*, fibrile (GODMAN şi PORTER[389], reprodus cu permisiunea editurii Rockefeller Institute Press).

Fig. 37. Condrocitul cartilajului traheal de şoarece, fixat la 60′ după injectare intraperitoneală de radiosulfat de sodiu. Cele mai multe granule apar concentrate în aparatul Golgi, de unde par a fi eliminate în matrice (FEWER, THREAGOLD şi SHELDON [324], reprodus cu permisiunea editurii Academic Press).

Scanned with OKEN Scanner

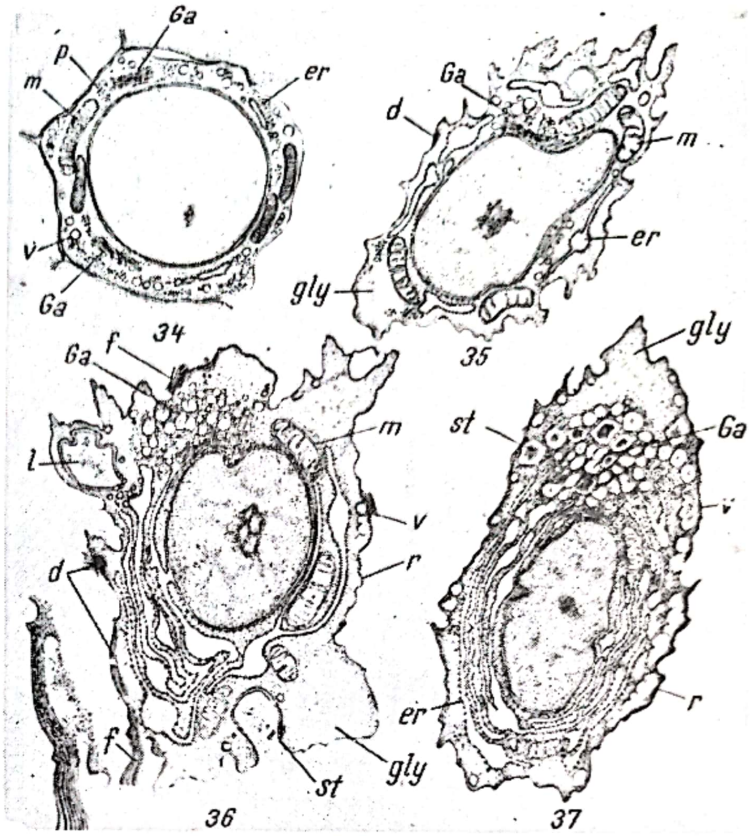


Fig. 36. Prezentare schematică a stadiilor de diferenţiere a celulei mezenchimale spre condroblast şi condrocit, cu ilustrarea organitelor celulare, dominante în fiecare stadiu. Legendă: 34, precondroblast; 35, condroblast tînăr; 36, condroblast matur; 37 condrocit; *m*, mitocondrii; *er*, reticul endoplasmic; *Ga*, aparat Golgi; *v* vezicule; *g*, granule libere de ribonucleoproteine; *gly*, granule de glicogen; *d*, vacuole deplasate spre periferia celulei, cu un conţinut mai dens la electroni; *r*, vacuole a căror membrană tinde să se contopească cu aceea a celulei; *st*, aspect de pinocitoză inversată, cu eliminarea conţinutului veziculelor la exterior; *f*, fibrile (GODMAN şi PORTER[389], reprodus cu permisiunea editurii Rockefeller Institute Press).

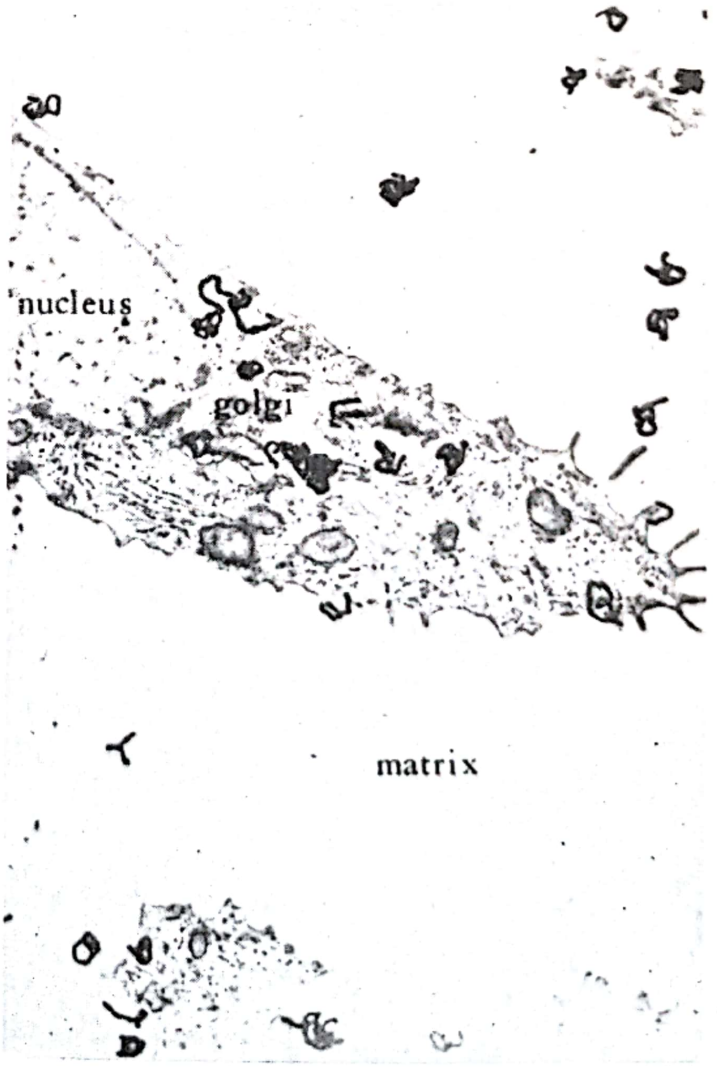


Fig. 37. Condrocitul cartilajului traheal de şoarece, fixat la 60′ după injectare intraperitoneală de radiosulfat de sodiu. Cele mai multe granule apar concentrate în aparatul Golgi, de unde par a fi eliminate în matrice (FEWER, THREAGOLD şi SHELDON [324], reprodus cu permisiunea editurii Academic Press).

Scanned with OKEN Scanner

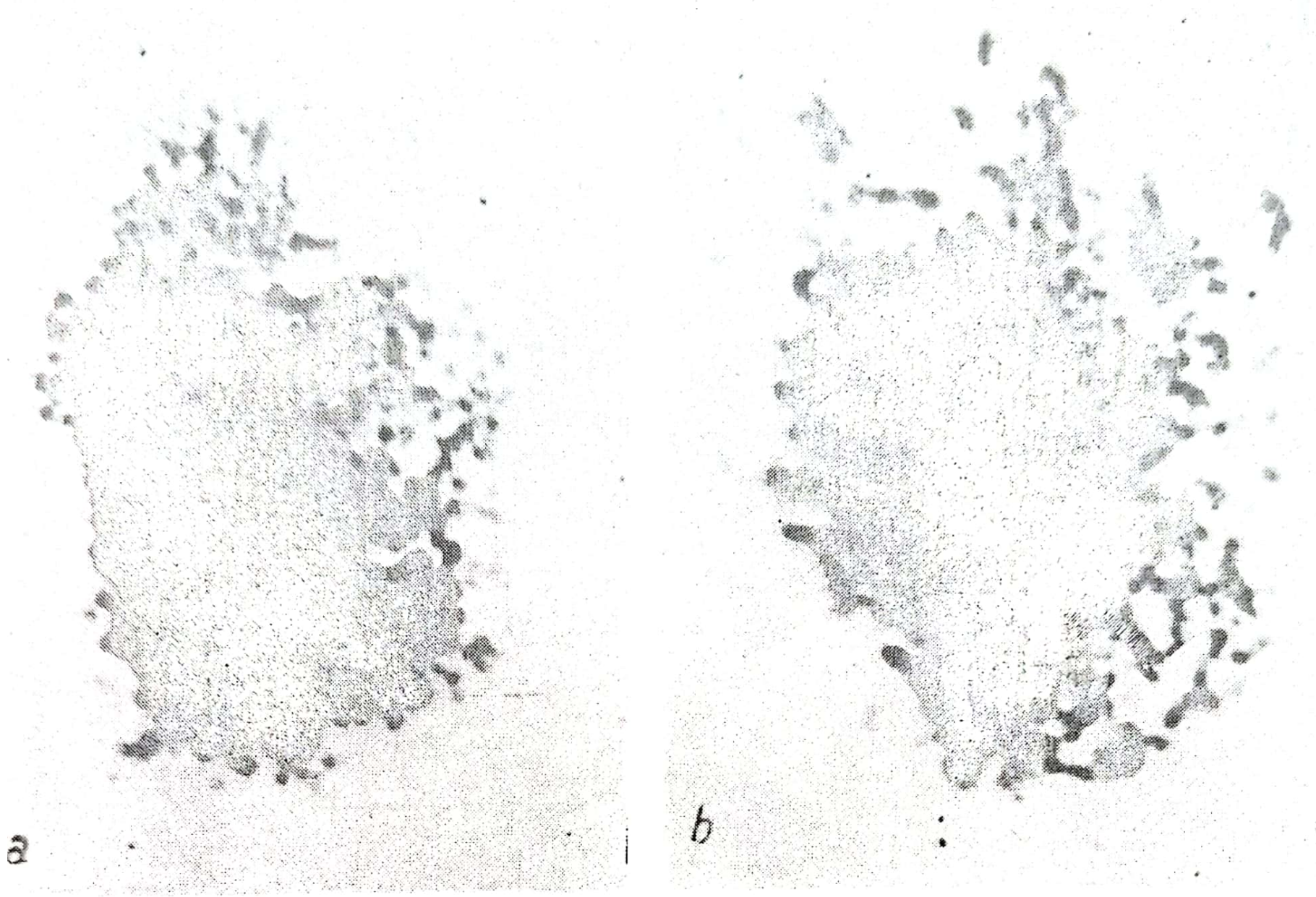


Fig. 38. a) Mastocit evidențiat pe amprentă prin colorarea metacromatică a granulelor cu albastru de toluidină, datorită prezenței grupelor sulfat (VELICAN C. și VELICAN D.[1118]); b) Mastocit evidențiat histoautoradiografic după administrare de radiosulfat, datorită tot încorporării grupelor sulfat în macromolecula de heparină (după MANCINI, VILAR, STEIN și FIORINI[693]).

Scanned with OKEN Scanner

zaharide, ca şi paternul sintezei lor sînt tulburate, fractura nu se consolidează în timpul obişnuit, existînd pericolul apariţiei pseudartrozelor, fie ca urmare a unei mineralizări insuficiente, fie ca urmare a formării unei matrici inadecvate mineralizării.

Mastocitul prezintă un interes deosebit datorită capacităţii lui de a sintetiza substanţe de tip heparinic. Studii cu radioizotopi au demonstrat că turnoverul radiosulfatului poate fi suprapus cu turnoverul heparinei din granulele mastocitare (*fig. 38*). Sinteza heparinei ar avea loc în aparatul Golgi, unde s-ar produce şi polimerizarea unităţilor repetabile, rezultînd complexe macromoleculare [844]. Nu se cunoaşte mecanismul prin care heparina polimerizată este transportată în granule. La microscopul electronic aceste granule par a rezulta din aglomerări de filamente citoplasmice, apoi de lamele, care se dispun paralel una cu alta, iar peste ele şi între ele se acumulează un material omogen, nestructurat. Eliminarea de heparină şi de histamină din celule se însoţeşte, în primul rînd, de dispariţia acestui material, sugerînd că el ar reprezenta mucopolizaharidul care a legat histamina. În mediul de cultură, heparina singură nu este acumulată în granule, ci formează vezicule. Dacă se adaugă însă mediului histamină sau serotonină, apar granule metacromatice în mastocite, prezentînd la microscopul electronic un patern simular cu granulele fiziologic constituite [242]. Plecîndu-se de la observaţiile noastre histochimice, privitoare la prezenţa de mucopolizaharide în nucleii mastocitelor [1113] s-a demonstrat, la microscopul electronic, eliminarea din nucleu spre citoplasmă a unor particule cu diametrul de 0,02 — 0,1 μ şi care s-ar transforma, apoi, în granule, direct, sau prin intermediul unor mitocondrii modificate [432]. Complexul macromolecular pe care heparina îl formează în granulele mastocitelor începe să fie din ce în ce mai bine analizat. Fiecare mm^3 din acest complex ar conţine 30 μg de heparină, 10 μg de histamină şi 0,072 μg de serotonină, ultimul component nefiind constant la toate speciile [100]. După alte determinări heparina din mastocite ar avea aceeaşi cantitate de hexozamină şi acizi uronici ca şi cea comercială, dar un conţinut mult mai redus de grupe sulfat, respectiv 3,13, faţă de 10,09% [957]. Cantitatea mai redusă de grupe sulfat ar justifica de ce heparina din mastocite nu are decît aproximativ 10% din activitatea anticoagulantă a heparinei comerciale. În alte lucrări se insistă asupra importanţei fracţiilor lipidice din complexele macromoleculare ale heparinei din mastocite, evidenţiindu-se în această fracţie 55% lecitină, 37% grăsimi neutre şi 8% colesterol [1055]. În lumina datelor actuale, granulele mastocitelor, graţie prezenţei heparinei, sînt considerate că ar acţiona ca o răşină schimbătoare de cationi, cu formarea rapidă de legături saline cu amine biogene. Prin procese competitive, pare posibil ca sodiul sau potasiul să înlocuiască histamina sau serotonina, care eliberate în acest fel, difuzează în afara celulei, fără a mai fi nevoie de o degranulare. Analizele noastre histochimice au demonstrat că stabilitatea structurală a complexului mucoprotidic din mastocitele de om este foarte redusă, el putînd fi eliminat în condiţiile existenţei unor acţiuni competitive care desfac legături electrostatice şi punţi de hidrogen. Acest aspect este reflec-

Scanned with OKEN Scanner

tat prin procesul de degranulare, ducînd la dispariţia totală a metacromaziei. Introducerea de legături artificiale intermoleculare (pretratare cu formol sau acid tanic), împiedică acest proces [1131].

În afara heparinei, analizele noastre histochimice au mai demonstrat în celulele cu aspect de mastocit prezenţa de acid hialuronic [1112], precum şi de variate tipuri de condroitin—sulfaţi. Predominanţa acestor sinteze a putut fi corelată, în cercetările menţionate, cu stadiul evoluţiei ontogenetice şi cu particularităţile ţesutului conjunctiv local [1099. 1105. 1114. 1117],

DEGRADARE

Catabolismul mucopolizaharidelor cuprinde : *a*) ruperea lanţului polimeric în unităţi oligo-, di- şi monozaharidice ; *b*) transformarea produşilor finali de clivaj în substanţe dializabile care, fie sînt eliminate prin circulaţia generală, fie intră din nou în ciclurile metabolice.

Glucozidazele care catalizează degradarea mucopolizaharidelor pot fi clasificate după următoarele particularităţi :

1. Tipul legăturii clivate : hexozaminidaze (gluco şi galactozaminidaze) şi hexuronidaze (glucuronidaze).

2. Poziţia legăturii clivate : atacarea la întîmplare a legăturilor situate în interiorul lanţurilor polimerului : endohexozaminidaze (hialuronidazele bacteriană şi testiculară, condroitinazele) şi endoglucuronidaze (hialuronidaza de lipitoare) ; atacarea preferenţială a legăturilor situate la extremitatea lanţului, liberînd astfel doar glucidele terminale : exoglucuronidaze (beta-glucuronidază), exohexozaminidaze (beta-glucozaminidaze, beta-galactozaminidaze).

3. Gradul de polimerizare a substratului : polizaharidaze (hialuronidaze, heparinaze, condroitinaze) şi oligozaharidaze (beta-glucuronidaze şi beta-glucozaminidaze).

Aceste enzime acţionează ca *hidrolaze*, determinînd ruperea conectărilor inter- şi intramoleculare prin fixarea unei molecule de apă. Anumiţi fermenţi aparţinînd glucozidazelor au, de asemenea, acţiuni de transglicozilare, efectuînd, în timpul hidrolizei substratului, transferul unor produşi de degradare către fracţiile moleculare mai mari. Printre factorii care ar putea influenţa paternul activităţii enzimatice în procesul de degradare a mucopolizaharidelor sînt de luat, în primul rînd, în considerare : concentraţia enzimei, concentraţia ionilor de hidrogen (pH-ul local), concentraţia electroliţilor şi prezenţa eventuală a inhibitorilor specifici şi nespecifici. Aceştia din urmă pot acţiona fie asupra substratului, fie asupra enzimei, fie asupra complexului substrat-enzimă.

Hialuronidazele (EC. 3.2.1.)

Prin acest termen se desemnează un complex enzimatic (acţionînd în mod particular asupra acidului hialuronic, dar capabil, de asemenea, să degra-

Scanned with OKEN Scanner

deze condroitinul, condroitin-sulfaţii A şi C) cu surse de sinteză variate : bacteriană (*Streptococcus haemolyticus, viridans, agalactiae, dysgalactiae, mitis*; *Staphylococcus aureus şi albus* : *Pneumococcus* tip I, II, III, VI VIII, XIII; *Clostridium perfringens*, tip A *welchii*; *Vibrio cholerae*; *Corynebacterium diphteriae*; *Salmonella typhosa*; *Proteus vulgaris*; *Escherichia coli*, etc.); tisulară (testicul, lichide cavitare, plasma sanguină, lizozomii celulelor în general); varia (lipitoare, venin de şarpe, celenterate, plathelminţi, anelide, molusce etc.)

HIALURONIDAZA TESTICULARĂ (EC. 3.2.1.d)

Acţionează ca o endohexozaminidază, hidrolizînd legăturile beta-N-acetilglucozaminidice ale acidului hialuronic şi legăturile beta-N-acetilgalactozaminidice ale condroitinului şi condroitin-sulfaţilor A şi C. Scăderea rapidă a vîscozităţii mucopolizaharidelor, sugerează că au fost rupte legături echidistante, situate în interiorul lanţului macromolecular. Produşii de degradare sînt oligozaharide, dintre care, aproximativ 80% apar sub formă de tetrazaharide, 10% ca dizaharide şi restul de 10%, ca variate forme de oligozaharide [734]. Dizaharidul final, acidul hialobiuronic, conservă intactă legătura glucuronidică, precum şi rezidiul acetilglucozaminidic, la capătul său reducător. Degradarea acidului hialuronic şi a condroitinului se efectuează într-un ritm asemănător, în timp ce moleculele sulfatate ale condroitin-sulfaţilor sînt desfăcute într-un timp mai lung. După desulfatare însă, atît condroitin-sulfatul C, cît şi A, devin la fel de rapid hidrolizabili, ca şi acidul hialuronic. Astfel, prezenţa radicalilor sulfat asigură un grad mai ridicat de stabilitate structurală a mucopolizaharidelor, creind, probabil, o protecţie sterică faţă de acţiunea anumitor enzime. În cadrul analizelor noastre histochimice asupra stabilităţii structurale a macromoleculelor am demonstrat că materialul metacromatic din matricea cartilajului îşi modifică susceptibilitatea faţă de hialuronidaze, în funcţie de prezenţa sau absenţa grupului sulfat [1107, 1131].

Hialuronidaza testiculară efectuează şi un proces de transglicozilare, care pare să fie particular acestei enzime [734]. El este caracterizat prin transferul anumitor produşi de degradare în alte fragmente de macromolecule, reconstituindu-se legăturile hexozaminidice normale, asemănătoare legăturilor rupte. Acumularea de tetrazaharide ca produşi finali ai hidrolizei enzimatice s-ar explica atît prin incapacitatea enzimei de a adînci, spre unităţi mai mici, procesul de degradare, cît şi prin incapacitatea acestor tetrazaharide de a servi ca acceptori pentru fragmentele transferate. Transglicozilarea efectuată de hialuronidaza testiculară apare extrem de evidentă dacă această enzimă este incubată cu un amestec de acid hialuronic şi condroitin sulfaţi. În produşii „hibrizi" care rezultă, dizaharizi nesulfataţi, provenind din hidroliza acidului hialuronic (şi care conţin gluco-

Scanned with OKEN Scanner

zamină) sînt legaţi cu dizaharizi sulfataţi, provenind din hidroliza condroitin-sulfaţilor (şi care conţin galactozamină) [654].

Datele acumulate pînă acum justifică afirmaţia că hialuronidaza testiculară are specificitate pentru fracţia glucuronică a mucopolizaharidelor. Aşa s-ar explica acţiunea catalitică netă exercitată asupra acidului hialuronic şi condroitin-sulfaţilor A şi C care au acelaşi tip de acid uronic,

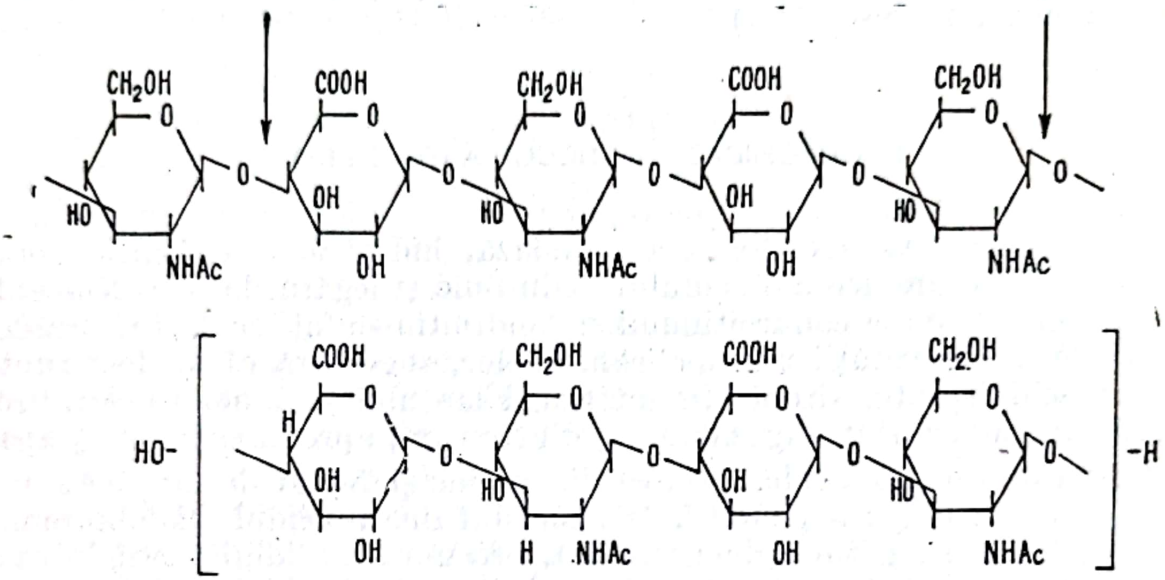


Fig. 39. Acţiunea hialuronidazei testiculare asupra lanţului polimerizat al acidului hialuronic; clivarea legăturilor beta-1.4 glucozaminidice, rezultînd, ca principal produs final al catalizei enzimatice, un tetrazaharid.

deşi hexozamina lor este diferită (glucozamină şi, respectiv, galactozamină). Aşa s-ar explica, de asemenea, absenţa hidrolizei asupra unor mucopolizaharide care conţin acid iduronic (heparină, heparitin-sulfat, condroitin-sulfat B). Punctele de atac ale hialuronidazei testiculare în lanţul polimerizat al acidului hialuronic sînt menţionate în *fig. 39*. Dublul rol al hialuronidazei testiculare, ca hidrolază şi transglicozilază, ca şi antigenicitatea diferită în comparaţie cu alte hialuronidaze, reflectă o structură chimică şi proprietăţi fizico-chimice şi biologice deosebite. Analizele biochimice au evidenţiat un nucleu proteic, la care este ataşat un mic lanţ glucidic conţinînd 5,2% hexoze, 5% hexozamize şi 0,3% acid sialic [165]. În alte investigaţii hialuronidaza testiculară a apărut ca o structură proteică pură, cu o greutate moleculară de aproximativ 14 414, conţinînd 16% azot. Fiecare moleculă ar îngloba 8 rezidii de acid glutamic, 10 rezidii de lizină, 14 rezidii de glicocol şi de serină [1022].

HIALURONIDAZA BACTERIANĂ (EC. 4.2.99.1)

Acţionează ca o endohexozaminidază, catalizînd degradarea specifică a acidului hialuronic, pînă la stadiul de dizaharide [734]. Desfacerea fiecărei

legături glucozaminidice determină eliminarea unei molecule de apă din fracţia acidului glucuronic, urmată de constituirea unei duble legături. Rezultă apariţia unor dizaharide nesaturate (delta-4.5-glucuronid-acetil-glucozamină).

Condroitinaza (EC. 3.2.1.c)

Izolată din extractul liofilizat de *Proteus vulgaris*, enzima s-a dovedit capabilă să atace condroitin-sulfaţii, graţie complexului de fermenţi pe care îi conţine şi care cuprind : polizaharidaze, oligozaharidaze şi condrosulfataze [283]. Acţiunea se exercită asupra legăturilor endohexozaminidice, rezultînd mai întîi oligozaharide, apoi tetrazaharide conţinînd o mixtură de dizaharide nesaturate, sulfatate şi nesulfatate [655]. Desulfatarea ulterioară, efectuată de condrosulfataze, duce la eliberarea de N-acetilcondrozină.

S-au izolat din grupul condroitinazelor două tipuri de enzime, unul cu acţiune de glucozidaze, al doilea de sulfataze. Studiul corelat al hidrolizei lor a demonstrat că efectele glucozidazei se pot exercita şi în prezenţa grupelor sulfat, în timp ce activitatea condrosulfatazei creşte cu cît lanţul polimerizat este desfăcut în unităţi mai mici. Acţionînd la un pH 8 şi la 38°C, se poate obţine cu aceşti fermenţi o degradare completă a condroitin-sulfaţilor.

Ca urmare a efectului anumitor cationi, care modifică configuraţia sterică a substratului, diminuă rigiditatea mucopolizaharidului şi legăturile sale apar mai uşor accesibile enzimei. Cînd concentraţia cationilor devine prea mare, macromolecula ia un aspect sferic, iar sediile hidrolizabile sînt blocate. Activitatea enzimei scade şi la concentraţii de cationi foarte reduse, întrucît rigiditatea lanţului polimerizat mucopolizaharidic creşte, iar distanţa dintre zonele reactive ce conţin legăturile susceptibile la cataliza enzimatică se măreşte. În ceea ce priveşte anionii, ei acţionează ca activatori ai enzimei, clorul în special fiind necesar proceselor catalitice efectuate de condroitinază.

Heparinaza (EC. 3.2.1.19)

Dispariţia activităţii anticoagulante a heparinei reprezintă testul cel mai fidel de acţiune specifică a acestei enzime. După administrarea parenterală a mucopolizaharidului, se constată excreţia unui produs intermediar de metabolism, uroheparina, lipsit de acţiune anticoagulantă, reflectînd capacitatea ţesuturilor de a degrada heparina exogenă. Alte studii privind efectele heparinazei au fost bazate pe utilizarea enzimelor produse de *Flavobacterium*, adaptat la heparină[838], şi la heparitin-sulfat[656]. Este vorba, probabil, de un complex enzimatic capabil să degradeze mucopolizaharidele menţionate, pînă la stadiul de oligozaharide, avînd la extremitatea redu-

Scanned with OKEN Scanner

cătoare glucozamina, în cazul heparinei şi acetilglucozamina, cînd substratul a fost heparitin-sulfatul. Ulterior, degradarea poate avansa spre dizaharide nesaturate, monozaharide şi rezidii sulfatate. Ar rezulta că heparinaza este o denumire dată unui complex enzimatic ce conţine o poliglucozidază (acţionînd ca o endoglucozaminidază), o oligoglucozidază (alfa-glucuronidază specifică pentru dizaharidele alfa, beta nesaturate), la

Tabelul

Particularităţile structurale şi sensibilitatea la digestii enzimatice

DENUMIREA POLIMERULUI	DIZAHARIDUL REPETABIL		GRUPUL SULFAT
	Monoza I	*Monoza II*	
Acid hialuronic	Glucozamină	Acid glucuronic	Absent
Condroitin	Galactozamină	Acid glucuronic	Absent sau 1 grup pe dizaharid
Condroitin-sulfat A (Condroitin 4-sulfat)	Galactozamină	Acid glucuronic	1 radical pe dizaharid (O-sulfat la C_4 al hexozaminei)
Condroitin-sulfat C (Condroitin 6-sulfat)	Galactozamină	Acid glucuronic	1 radical pe dizaharid (O-sulfat la C_6 al hexozaminei)
Condroitin-sulfat B (dermatan-sulfat)	Galactozamină	Acid iduronic	1 radical pe dizaharid (O-sulfat la C_1 al hexozaminei)
Heparină	Glucozamină	Acid iduronic Acid glucuronic	5 radicali pe tetrazaharid (N-sulfat la C_2 al hexozaminei, O-sulfat la C_2 al iduronatului şi la C_6 al hexozaminei).
Heparitin-sulfat	Glucozamină	Acid iduronic Acid glucuronic	2 radicali pe tetrazaharid (N-sulfat la C_2 al hexozaminei şi O-sulfat la C_6 al hexozaminei).
Keratosulfat	Glucozamină	Galactoză	1 radical pe dizaharid (O-sulfat la C_6 al hexozaminei).

Scanned with OKEN Scanner

care se asociază o sulfamidază şi o sulfoesterază, avînd capacitatea de a libera grupările N-sulfat şi O-sulfat. Sensibilitatea particulară a heparinei şi heparitin-sulfatului faţă de complexul enzimatic din *Flavobacterium*, adaptat pentru fiecare din aceste mucopolizaharide, este probabil legată de prezenţa grupărilor sulfamino, desulfatarea creind o rezistenţă marcată

V

a principalelor mucopolizaharide acide

GRUPAREA ACETIL	LEGĂTURI		DIGESTII ENZIMATICE
1 grup pe dizaharid	beta-1.4 glucozaminidice	beta-1.3 glucuronidice	Hialuronidază bacteriană Hialuronidază de lipitoare Hialuronidază testiculară
1 grup pe dizaharid	beta-1.4 galactozaminidice	beta-1.3 glucuronidice	Hialuronidază testiculară Hialuronidază bacteriană
1 grup pe dizaharid	beta-1.4 galactozaminidice	beta-1.3 glucuronidice	Hialuronidază testiculară Condroitinază
1 grup pe dizaharid	beta-1.4 galactozaminidice	beta-1.3 glucuronidice	Hialuronidază testiculară Condroitinază
1 grup pe dizaharid	beta-1.4 galactozaminidice	beta-1.3 glucuronidice	Flavobacterium adaptat
Numai în regiunea de legătură cu proteina	alfa-1.4 glucozaminidice	alfa-1.4 iduronidice sau glucuronidice	Heparinază Flavobacterium adaptat
1 grup pe tetrazaharid	1.4 glucozaminidice	Neprecizate	Flavobacterium adaptat
1grup pe dizaharid	beta-1,3 glucozaminidice	beta-1.4 galactozidice	beta-glucozaminidază beta-galactozidază

Scanned with OKEN Scanner

la digestie enzimatică [656]. Această posibilitate de a adapta activitatea fermentului la particularităţile substratului, cu scopul de a mări specificitatea enzimei, şi-a găsit o interesantă aplicabilitate în histochimie [1223].

Oligozaharidazele

Produşii obţinuţi după degradarea exhaustivă a mucopolizaharidelor de către polizaharidaze sînt ulterior clivaţi de către oligozaharidaze: glucuronidaze, glucozaminidaze, galactozaminidaze, galactozidaze. Acestea acţionează asupra legăturilor situate la periferia moleculelor, liberînd unităţile constitutive de tipul acidului glucuronic, glucozaminei, galactozaminei şi galactozei. Majoritatea acestor oligozaharidaze se găsesc în lizozomii celulelor. Dintre ele vom menţiona în mod special hexozaminidazele şi beta-glucuronidazele.

LIZOZIMUL (EC. 3.2.1.17)

Cea mai cunoscută dintre hexozaminidaze, lizozimul, reprezintă prima enzimă a cărei structură tridimensională a fost complet elucidată. Indiferent de sursa din care provine fermentul, el prezintă aceaşi activitate biologică, caracterizată prin desfacerea legăturilor beta (1→4) glucozaminidice, existente în molecula oligozaharidului. Deoarece substratul utilizat pentru a le identifica este polimerul beta (1→4) al rezidiilor alternante N-acetilmuramil şi N-acetilglucozaminil, enzima mai este denumită beta-glucozaminidază sau N-acetilmuramid glicanhidrolază.

Acţiunea enzimei duce la apariţia concomitentă a unor produşi cu greutate moleculară redusă, precum şi a unor oligozaharide avînd un lanţ molecular mai lung decît substratul iniţial. Aceste date sugerează că lizozimul, ca şi hialuronidaza testiculară, catalizează concomitent hidroliza şi transglicozilarea [687, 989].

Studii cristalografice au localizat centrul activ al enzimei într-o zonă alcătuită din şase subunităţi, capabile să se adapteze independent la şase rezidii glucidice. În mod particular a atras atenţia prezenţa, în acest centru activ, a cel puţin trei molecule de triptofan, sugerînd participarea grupelor triptofanil la formarea complexelor lizozim-substrat [249].

BETA-GLUCURONIDAZA (EC. 3.2.1.31)

Este enzima cea mai bine studiată dintre exooligozaharidaze, fiind importantă prin prezenţa sa în lizozomii celulelor, de unde poate fi elibe-

Scanned with OKEN Scanner

rată în toate interstiţiile conjunctivo-vasculare. Acţiunea se caracterizează prin hidroliza legăturii beta-glucuronidice, avînd ca rezultat liberarea acidului glucuronic, aşa cum se vede în *fig. 40.*

★

În afara activităţilor enzimatice, menţionăm un mecanism particular, care intervine în depolimerizarea ireversibilă a acidului hialuronic, individualizat sub denumirea de *depolimerizare oxidoreducătoare* sau *reacţia*

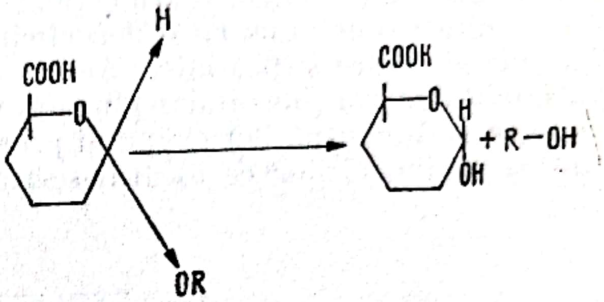


Fig. 40. Acţiunea beta-glucuronidazei asupra mucopolizaharidelor: clivarea legăturilor glucuronidice, cu liberarea acidului glucuronic, situat la capătul terminal al lanţului macromolecular.

ORD [858], [859]. Se bazează pe acţiunea reducătoare, exercitată de ioni metalici, tioli, cisteină, acid ascorbic etc. în prezenţa oxigenului molecular asupra acidului hialuronic din substanţa fundamentală, lichid sinovial, umoare vitroasă, cordon ombilical; rezultă o depolimerizare de tipul celei obţinute după digestie blîndă cu hialuronidază.

★

În tabelul V sintetizăm principalele date privind structura, sinteza şi degradarea mucopolizaharidelor acide.

Scanned with OKEN Scanner

Sub această denumire vom prezenta macromoleculele din ţesutul conjunctiv avînd în comun : *a*) un grup prostetic, constituit din unul sau mai multe hetero-oligozaharide (mai rar heteropolizaharide) ; *b*) absenţa unor unităţi repetabile cu o periodicitate fixă ; *c*) legături covalente între fracţiile glucidice şi protidice. Aceste macromolecule se diferenţiază prin : variabilitatea conţinutului în glucide, variabilitatea numărului, constituţiei chimice şi dimensiunilor grupului prostetic glucidic şi, în sfîrşit, prin diversitatea aminoacizilor ce alcătuiesc fracţia proteică.

STRUCTURĂ

Cu toată marea variabilitate a conţinutului în glucide, în toate glicoproteinele izolate şi analizate au fost evidenţiate aceleaşi monoze : hexoze (D-galactoză, D-manoză şi, mai rar, D-glucoză), hexozamine (D-galactozamina, D-glucozamina, în general acetilate), L-fucoza şi acidul sialic. Nu se semnalează prezenţa acizilor uronici şi a grupelor sulfat în glicoproteinele constitutive ale ţesutului conjunctiv.

Diferenţele cantitative şi de poziţie sterică a fracţiilor glucidice, explică marea diversitate structurală a acestor complexe macromoleculare, variatele lor funcţii, specificităţi de organ şi ţesut, modificări legate de evoluţia ontogenetică, reacţii imunologice diferite etc.

Factorul dominant în structura glicoproteinelor pare a fi reprezentat de tipul glucidului situat la periferia lanţului hidrocarbonat. Această poziţie este ocupată cel mai des de acidul sialic, unit cu rezidiul glucidic adiacent printr-o legătură alfa-cetozică, susceptibilă în general atît la digestia cu sialidază, cît şi la hidroliza acidă blîndă. Prezenţa grupării carboxil libere a acidului sialic şi posibilitatea eliminării lui selective din complexul macromolecular prin digestie enzimatică specifică, constituie particularităţi utile pentru evidenţierea histochimică a glicoproteinelor. De asemenea, din punct de vedere biologic, prezenţa sarcinilor electrice negative libere conferă glicoproteinei bogate în acid sialic capacitatea de polielectrolit.

Fucoza apare de asemenea frecvent la extremitatea lanţului glucidic al glicoproteinelor, sugerîndu-se existenţa unei relaţii cantitative inverse între fucoză şi acid sialic, fapt care ar influenţa gradul hidrofiliei macromoleculei respective. Cu cît acidul sialic este mai abundent, glicoproteina va fi mai bogată în grupări carboxilice hidrofile ; dimpotrivă, cu cît fucoza

Scanned with OKEN Scanner

va fi mai abundentă, glicoproteina va fi mai bogată în grupări metil hidrofobe [279].

Secvenţa cea mai des întîlnită în fracţia hidrocarbonată a glicoproteinelor este : N-acetilglucozamina-D-galactoză şi acid sialic (fig. 41) sau fucoză. De asemenea, analizele chimice au demonstrat existenţa a

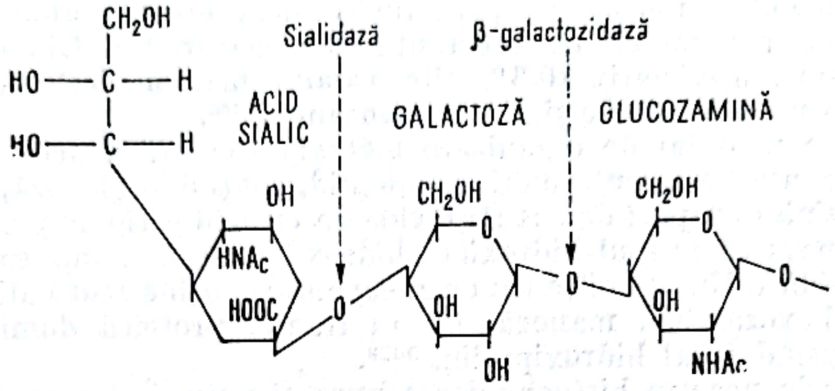


Fig. 41. **Trizaharidul terminal al unui lanţ glucidic din glicoproteine.**

două tipuri principale de legături între acest lanţ glucidic şi fracţia proteică, respectiv : *a*) legături O-glicozidice, între gruparea reducătoare a hexozaminei şi grupul hidroxil al serinei şi al treoninei [122] : *b*) legături N-glicozidice, conectînd gruparea reducătoare situată în poziţia C_1 a N-acetilhexozaminei, cu grupul amidă al asparaginei. S-a mai sugerat prezenţa de legături ester-glicozidice, apărînd între radicalii beta şi gamma carboxilici liberi ai acizilor aspartic şi glutamic, pe de o parte şi gruparea hidroxil reducătoare a glucozaminei, pe de altă parte [310, 401].

Glicoproteina din reticulină şi membrane bazale

Analizele biochimice şi fizico-chimice asupra unor reţele reticulinice sau membrane bazale izolate şi purificate au permis să se evidenţieze :

— În reticulina din piele, splină şi ganglioni limfatici, o structură caracterizată prin prezenţa a două lanţuri polipeptidice, formate din galactoză sau manoză şi 3 molecule de N-acetilglucozamină [1015].

— În reticulina din splină, o glicoproteină avînd cantităţi de galactoză, manoză, fucoză şi hexozamină mult mai mici decît seromucoidul, protrombina sau gamma-globulina [967].

— În reticulina din vase şi din variate alte teritorii conjunctive, o glicoproteină conţinînd glicopeptide cu hidroxiprolină, de care sînt fixate fracţii glucidice, alcătuite din glucoză, manoză, fucoză, galactozamină, glucozamină şi galactoză. Aceste glicopeptide cu hidroxiprolină au fost considerate ca unităţile structurale şi metabolice ale reticulinei [977].

Scanned with OKEN Scanner

— În membrana bazală a glomerulilor renali s-au identificat oligozaharide, constituite din unităţi de glucoză şi galactoză, legate de colagen şi de un complex sialo-fuco-hexozamino-glican [280]. Glucoza şi galactoza există în raport de 3/4, ambele fiind ferm ataşate colagenului. În schimb, raportul hexoze/hidroxiprolină a apărut foarte variabil, cu diferenţe pînă la 100%. Nu s-au putut preciza particularităţi în modul de ataşare a oligozaharidelor la nucleul polipeptidic al glicoproteinei, anumite rezultate sugerînd asparagina ca substanţă de legătură [623]. Oligozaharidele ar reprezenta aproximativ 10,3% din totalul macromoleculei, în acest procent intrînd 9% hexoze şi 1,3% hexozamine [565].

Analiza modului de organizare macromoleculară a acestor componente a evidenţiat existenţa unui glicopeptid, conţinînd glucoză, galactoză şi hidroxilizină în raport de 1 :1 :1. Oxidarea cu acid periodic şi dinitrofenilarea au sugerat că grupul hidroxil al hidroxilizinei ar fi implicat în legătura glucozidică. Un al doilea tip de glicopeptid conţine acid sialic, fucoză, galactoză, hexozamine, manoză, iar în fracţia proteică domină acidul aspartic, lipsind total hidroxiprolina [1023].

Analizele noastre histochimice asupra structurii şi organizării macromoleculare a reticulinei şi membranelor bazale ne-au permis să formulăm următoarele concluzii:

— Apariţia argintofiliei a fost corelată cu prezenţa grupelor hidroxil ale hexozelor, libere să fie convertite prin oxidare în grupări aldehidice; impregnabilitatea este reversibil blocată prin acetilare şi deblocată după saponificare (*fig. 42*). În schimb fenilhidrazina blochează ireversibil grupele hidroxil transformate în carbonil prin oxidare; de asemenea, impregnabilitatea dispare dacă grupările carbonil sînt convertite în carboxil, prin oxidări de lungă durată [1126] [1139].

— Dispoziţia la suprafaţa complexului macromolecular a grupelor acide variază de la un teritoriu conjunctiv la altul, coloranţii electronegativi nefiind legaţi de reţelele reticulinice şi de membranele bazale din miocard, pulpa splenică, ganglioni limfatici, pancreasul exocrin, zonele fasciculată şi reticulată ale suprarenalei; în schimb, în plămîn, ficat, medulosuprarenală şi pancreasul endocrin, apare o legare dezordonată a cationilor, rezultînd o slabă bazofilie, în timp ce, în membranele bazale din jurul tubilor renali şi celulele zonei glomerulate a suprarenalei, grupele acide au o dispoziţie spaţial ordonată, legînd coloranţii bazici cu apariţia unei reacţii metacromatice [1137], aspect demonstrat în *fig. 43*.

— Grupele hidroxil vicinale sînt mai frecvente în reticulina din rinichi, plămîn şi pancreas exocrin, în comparaţie cu miocardul, splina, suprarenala şi ganglionul limfatic, reactivitatea cea mai redusă apărînd în ficat;

— Există variaţii în organizarea macromoleculară a membranelor bazale ce pot fi corelate cu particularităţile funcţionale ale parenchimurilor respective; la pacienţii cu hipoaciditate, în membranele bazale din jurul glandelor fundice ale mucoasei gastrice apare un număr mai mare de glucide histochimic reactive, mai ales acid sialic, în comparaţie cu hiperacizii [1136].

Scanned with OKEN Scanner

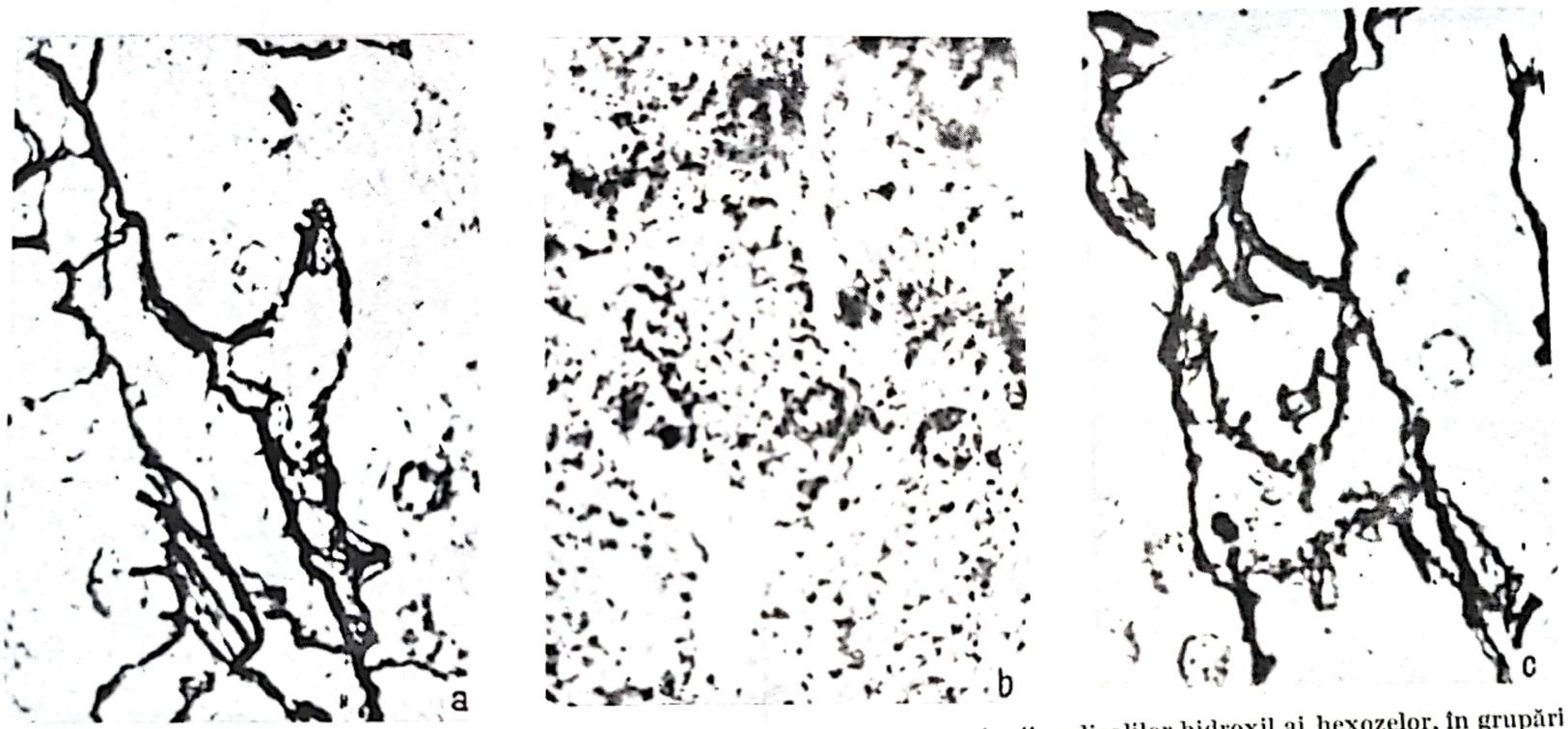
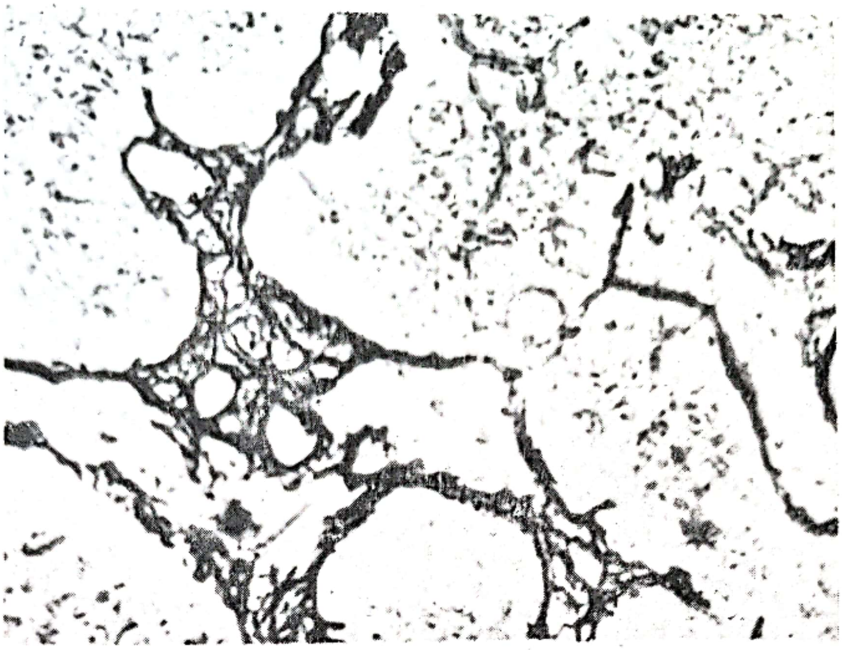


Fig. 42. a) Impregnaţie argentică a reticulinei hepatice, ca urmare a conversiunii radicalilor hidroxil ai hexozelor, în grupări carbonilice, dotate cu capacităţi reducătoare. b) Dispariţia impregnabilităţii după acetilare, ca urmare a blocării grupărilor hidroxil. c) Reapariţia impregnabilităţii prin deblocarea hidroxililor, consecutiv saponificării (VELICAN C. şi VELICAN D.[1126], reprodus cu permisiunea editurii Springer).

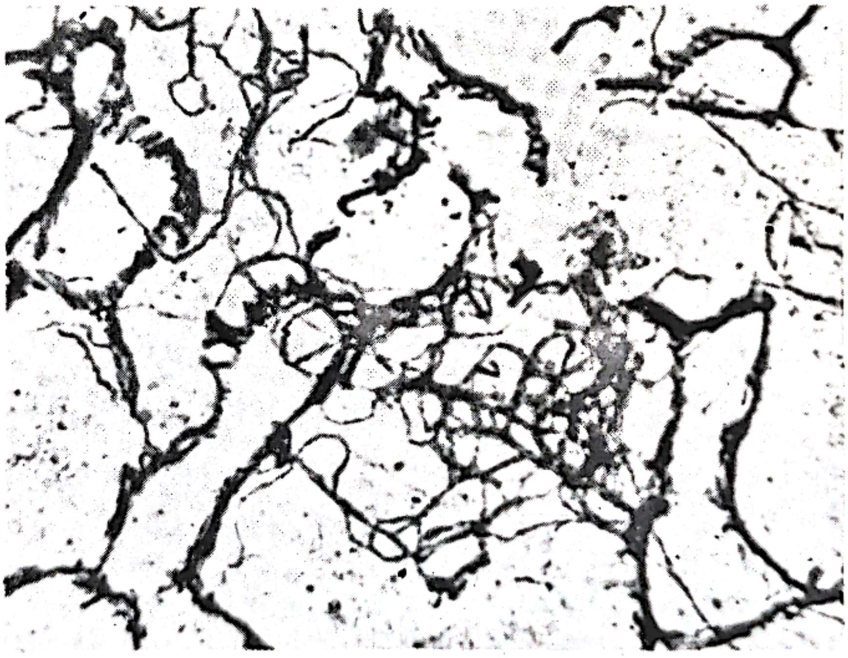
Scanned with OKEN Scanner

Fig. 43. a) Glicoproteinele din reţeaua reticulinică a zonei glomerulate a suprarenalei prezintă o intensă concentrare de grupări carboxilice de suprafaţă, aparţinînd acidului sialic, reflectată de apariţia metacromazinei la coloraţia cu albastru de toluidină. b) Glicoproteinele din reţeaua reticulinică a zonei fasciculate a aceleiaşi suprarenale, nu leagă cationii de colorant, sugerînd absenţa sarcinilor electronegative libere, de suprafaţă (× 880).

Scanned with OKEN Scanner



a



b

Fig. 44. a) Aspectul „normal" al reţelelor perisinusoidale reticulinice din ficatul de om. b) Derularea, dispersarea şi dezorganizarea aceloraşi reţele cu dispoziţie perisinusoidală, obţinută prin eliminarea hexozaminelor, consecutiv digestiei cu lizozim (VELICAN D. şi VELICAN C.[1138], reprodusă cu permisiunea editurii McMillan).

Scanned with OKEN Scanner

— Anumite modificări în structura chimică a reţelelor reticulinice şi membranelor bazale, au putut fi corelate cu vîrsta lor biologică. Astfel, în membranele bazale ale glomerulilor renali, bogăţia de acid sialic şi, respectiv, încărcarea de suprafaţă cu sarcini electrice negative libere, este mai mare la copil, în comparaţie cu adultul; de asemenea, anumite membrane bazale de neoformaţie par a avea lanţurile polipeptidice ale fracţiei proteice interconectate în special prin punţi de acid sialic, fiind complet dezorganizate după incubaţii cu sialidază [1107, 1139].

— Hexozaminele au o poziţie sterică particulară în anumite reţele reticulinice, jucînd rolul de principal ciment stabilizator, care conectează aceste reţele de tubul endotelial capilar. Eliminarea acestor substanţe prin digestie cu hexozaminidaze (lizozim) a determinat o derulare, dispersare şi dezorganizare a reţelelor reticulinice cu dispoziţie pericapilară din ficat, splină, miocard şi plămîn [1126, 1138, 1139]. Un aspect caracteristic al acestui proces, neobţinut cu nici o altă enzimă glicolitică sau proteolitică, nici cu un anumit tip de extracţie chimică, este ilustrat în *fig. 44.*

Datele prezentate, coroborate cu observaţii de microscopie electronică şi analize biochimice, sugerează că reticulina şi membranele bazale sînt structuri alcătuite din complexe glicoprotidice cu o organizare macromoleculară particulară, variabilă probabil, în funcţie de specializarea funcţională a organului sau ţesutului respectiv, de vîrsta biologică a reţelelor, de stadiul evoluţiei ontogenetice şi de numeroşi alţi factori, doar în parte cunoscuţi. În aceste complexe glicoproteice este inclus şi colagenul, fie integrat în unităţi glicopeptidice, fie stocat printre aceste unităţi (sub forme rudimentare de agregare), fie sub aspect de fibre cu periodicitatea caracteristică. Se poate deci afirma că vechile concepţii, care considerau reticulina ca o formă „imatură" a fibrei de colagen, apar neconfirmate de cercetările actuale.

Reticulina şi membranele bazale sînt complexe glicoprotidice, în care colagenul poate fi integrat, stocat sau lăsat să precipite sub formă fibrilară. Intensitatea acestui proces de fibrilogeneză stă la baza înlocuirii reticulinei prin colagen, respectiv a colonizării unei matrici glicoprotidice prin fibrile alcătuite din macromolecule scleroproteice. Date mai amănunţite în legătură cu acest subiect au fost prezentate de unul dintre noi într-o lucrare cu caracter monografic [1134].

Glicoproteine de „structură"

Sub această denumire se descriu glicoproteinele ce intră în constituţia anumitor fibre din ţesutul conjunctiv, alcătuind 10—25% din totalul macromoleculelor acestor fibre [906]. În afara glicoproteinei din reticulină pe care, datorită importanţei deosebite în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv am prezentat-o separat) menţionăm:

— glicoproteina de „structură" din cornee, conţinînd manoză, galactoză, glucozamină, fucoză şi acid sialic. În mod particular această glico-

Scanned with OKEN Scanner

proteină ar mai cuprinde şi esteri sulfat [904]; cantitatea de glicoproteină este de 600 μg la 1 g de ţesut cornean umed, fiind legată de fracţia insolubilă a colagenului şi atribuindu-i-se rolul de antigen în reacţiile imunologice constatate după keratoplastii [907];

— glicoproteina izolată din aorta de om, ca urmare a digestiei cu papainã; analiza chimică a evidenţiat o fracţie glucidică conţinînd 17,8% hexozamine, 14,0% hexoze, 1,6% fucoză şi 8,1% acid sialic la 100 g greutate uscată. Ar exista următoarele raporturi molare: glucozamină/galactozamină 2,7; galactoză/manoză 3,0 [170]. Rezidiile galactozice şi glucozice sînt situate în poziţii terminale, la capătul nereducător al lanţului, contribuind la conferirea antigenicităţii macromoleculei [112].

Glicoproteine prezente în condiţii patologice

Frecvenţa cu care se întîlnesc aceste glicoproteine în ţesutul conjunctiv în inflamaţii, procese imunologice, proliferări neoplazice şi variate alte tipuri de leziuni, alcătuind complexe macromoleculare patologice cu componentele normale ale substanţei fundamentale şi fibrelor, impun cunoaşterea amănunţită a structurii lor chimice.

GLICOPROTEINA ALFA$_1$-ACIDĂ

Constituie elementul cel mai important de reactivitate histochimică a exudatelor PAS-pozitive, datorită bogăţiei în fracţii glucidice, care alcătuiesc aproximativ 40% din macromoleculă. Aceste fracţii înglobează 6,5% manoză, 6,7% galactoză, 15,3% hexozamine, 10,8% acid sialic şi 0,7% fucoză [310]. Se sugerează ca structură: *a*) un singur lanţ polizaharidic, ataşat fracţiei proteice; *b*) mai multe lanţuri oligo- sau polizaharidice, ataşate aceleiaşi fracţii proteice; *c*) un lanţ unic, constituit din fragmente alternante, glucidice şi protidice. Ipoteza a doua pare a fi cea mai bine fundamentată, susţinîndu-se existenţa a 8—15 mici lanţuri glucidice, denumite convenţional „unităţi" polizaharidice [533]. Ele ar avea la capătul terminal acidul sialic, care stabilizează structural glicoproteina, exercitînd o protecţie sterică faţă de unităţile glucidice şi protidice dispuse spre interiorul macromoleculei. În ceea ce priveşte zona de conectare glicoprotidică, ea include legături între N-acetilglucozamină şi gruparea beta amidă a asparaginei.

IMUNOGLOBULINELE

Structura lor este caracterizată prin existenţa a două lanţuri grele (H), cu greutate moleculară de 50 000 — 70 000 şi două lanţuri uşoare (L), cu greutate moleculară de 20 000. Fiecare lanţ greu este conectat de cores-

Scanned with OKEN Scanner

pondentul său uşor printr-o legătură disulfidică. Fracţia glucidică se găseşte în lanţurile grele, legată covalent de gruparea carboxil terminală a fracţiei proteice. Dintre imunoglobuline, cea denumită Ig G, mai adînc studiată din punctul de vedere al structurii, conţine 0,94% hexoze, 0,20% fucoză, 1% hexozamine şi 0,20% acid sialic [913].

Lanţul oligozaharidic este intens ramificat, avînd ca grupări terminale nereducătoare 3 rezidii glucozaminice, 2 rezidii de fucoză şi 1 rezidiu de acid sialic [217]. Fracţia glucidică este ataşată celei proteice prin intermediul unei legături N-glicozidice între N-acetilglucozamină şi acidul aspartic [294].

FIBRINOGENUL

Pare a fi constituentul major al numeroaselor complexe macromoleculare care apar în ţesutul conjunctiv patologic sub aspectul fibrinoidului. Reactivitatea sa histochimică este corelată în special cu fracţia glucidică, ce reprezintă numai 1,6—3,2% din volumul macromoleculei. Această fracţie cuprinde 0,8% acid sialic, 1,7% hexoze şi 1% glucozamină [617].

Fiecare lanţ glucidic este alcătuit din 3 molecule de galactoză, 3 molecule de glucozamină, 4 molecule de manozamină şi 2 molecule de acid sialic [732]. Acidul sialic se găseşte în poziţie terminală, fiind ataşat de galactoză. Transformarea fibrinogen-fibrină ar duce, în primul rînd, la eliminarea acidului sialic; între grupările amino, pe de o parte, şi grupările carbonilice ale rezidiilor glucidice demascate, pe de altă parte, apare apoi un produs de tip bază Schiff [618]. În prima etapă a acestei transformări, catalizată de trombină, sînt liberate peptide şi anumite glucide, rezultînd apariţia monomerului fibrinei. În a doua etapă, acest monomer se polimerizează, prin formarea de numeroase punţi de hidrogen între macromolecule, ca şi de legături coordinativ-covalente [304]. În sfîrşit, în a treia etapă, fibrinaza catalizează transformarea fibrinei solubile în formă insolubilă, determinînd „vulcanizarea" reţelei de fibrină, prin formarea unui număr cît mai mare şi mai ferm de legături intermoleculare. Ele rezultă în special ca urmare a unui proces de transamidare implicînd, ca donator, grupul alfa amino al unui rezidiu glicil-N- terminal şi, ca acceptor, grupul beta-carboxil-amidă al rezidiului asparaginil, legat de fracţia glucidică. Rezultă o legătură transversală, care, multiplicată în diferite locuri, realizează insolubilizarea reţelei de fibrină prin convertirea unei normostabilităţi, în hiperstabilitate structurală.

SINTEZĂ

Nu s-au semnalat aspecte particulare în geneza fracţiei proteice a glicoproteinelor.

În ceea ce priveşte sinteza glucidelor, numeroase date au fost prezentate în subcapitolul anterior, privind mucopolizaharidele. De aceea, rîndurile care urmează se limitează numai la biogeneza fucozei şi a acidului sialic.

Scanned with OKEN Scanner

Fucoza

Sinteza L-fucozei (metilpentoză, 6-dezoxihexoză) implică efectuarea unei reduceri la C_6, asociată cu inversiunea configuraţiei atomilor de la C_2, C_3 şi C_5 ai moleculei inductoare, glucoza. Inversiunea la C_2 este realizată în stadiul de hexozofosfat; rezultă manoză-6-fosfat, încorporat ulterior în derivatul nucleotidic guanozin-difosfo-manoză. Conversiunea acestuia în guanozin-difosfo-fucoză, necesită apariţia produsului intermediar 4-ceto-6-dezoximanoză, rezultat al unui proces de oxido-reducere intramoleculară [339]. Efectul activator constatat după adăugarea de nicotinamidă-adenin-dinucleotid (în cantităţi catalitice) sugerează că această substanţă intervine în transferul electronilor.

Acidul sialic

Denumirea este utilizată pentru o întreagă familie de derivaţi, acil substituiţi, ai acidului neuraminic (acid 2-ceto-5-amino-3.5-didezoxinonic), produs de condensare aldolică între acidul piruvic şi manozamină. Piruvatul va da naştere lanţului $\rightarrow C_1$ C_3, în timp ce manozamina devine fracţia atomilor $C_4 \rightarrow C_9$ ai moleculei de acid sialic.

Cei 5 derivaţi, mai bine cunoscuţi, ai acidului sialic sînt: 1) acidul N-acetilneuraminic; 2) acidul N-glicolil neuraminic; 3) acidul 4-O-acetil-N-acetil neuraminic; 4) acidul 7-O-acetil-N-acetil neuraminic; 5) acidul O-diacetil-N-acetil neuraminic. Singurul reprezentant al acestei clase, pus în evidenţă pînă în prezent în ţesutul conjunctiv, este acidul N-acetil neuraminic, termenul de acid sialic utilizat în cuprinsul lucrării referindu-se la această substanţă.

Observaţia că aldolaza din *Clostridium perfringens* clivează acidul sialic în piruvat şi N-acetil-manozamină, şi că reacţia este reversibilă, a sugerat rolul acestei enzime în sinteza acidului sialic [231].

Investigaţii ulterioare pledează mai mult pentru o biogeneză prin intermediul precursorilor fosforilaţi, cu desfăşurare în trei etape: *a*) procesul de conversiune al N-acetilmanozaminei în derivatul său fosforilat, reacţia fiind catalizată de o kinază care acţionează în prezenţa adenozintrifosfatului şi a ionilor de magneziu; *b*) cuplarea N-acetilmanozaminei-6-fosfat cu fosfoenolpiruvatul, reacţie catalizată de o enzimă de condensare, rezultînd derivatul fosforilat al acidului sialic; *c*) un proces de defosforilare, urmat de apariţia acidului N-acetil neuraminic. În *fig. 45* sînt prezentate principalele reacţii care duc la sinteza acidului sialic.

Modul în care moleculele glucidice sînt ulterior integrate în complexul glicoprotidic este doar în parte precizat.

Acest proces poate avea loc pe două căi: fie prin adăugarea succesivă a monomerilor glucidici la nucleul peptidic, fie prin încorporarea

Scanned with OKEN Scanner

lor într-un oligozaharid şi ataşarea lanţului preformat la nucleul peptidic.

Studii efectuate la nivelul celulei hepatice sugerează că încorporarea fracţiilor glucidice depinde de sinteza „de novo" a peptidelor, substanţele care blochează această sinteză inhibînd şi încorporarea glucidelor [751].

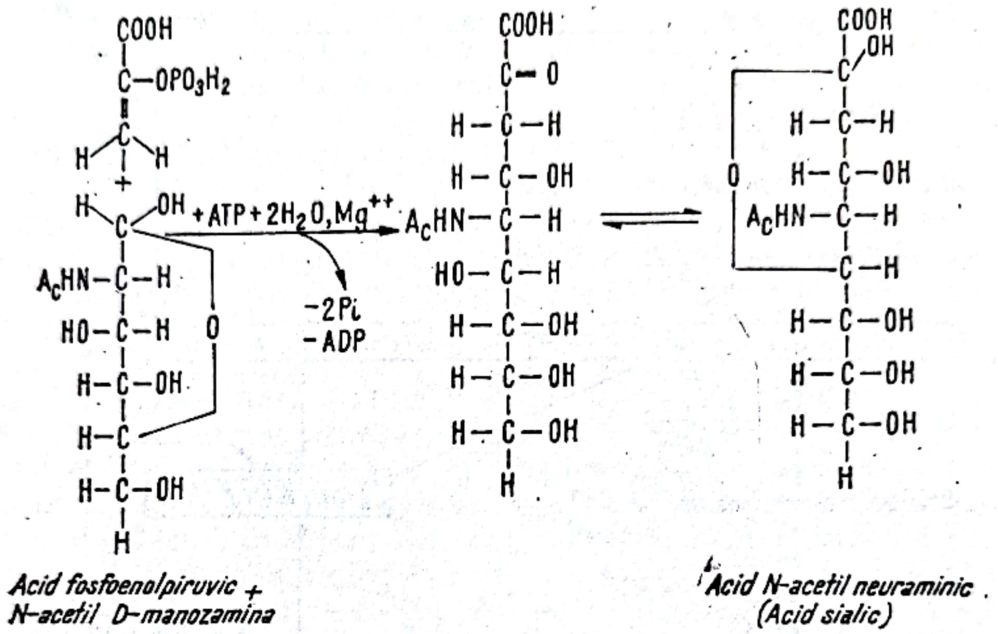


Fig. 45. Sinteza acidului sialic.

Rapiditatea cu care glucozamina marcată este legată de nucleul peptidic al glicoproteinei, ar putea indica înglobarea hidraţilor de carbon în macromoleculă, chiar în momentul sintezei acizilor aminaţi. După legarea glucozaminei de proteine, celelalte monoze ar fi adiţionate ulterior, pe măsură ce proteina neoformată avansează spre exteriorul celulei. Acidul sialic este legat cel din urmă, includerea sa mărind brusc hidrofilia macromoleculei glicoproteice.

În alte investigaţii, se subliniază importanţa derivaţilor nucleotidici conţinînd oligozaharide [540]. Studiile asupra biogenezei glicoproteinelor au pus în evidenţă variate astfel de tipuri de complexe nucleotidice, cel mai particular fiind întîlnit în analiza biogenezei acidului sialic. Acest complex nucleotidic, citidin 5'-monofosfo-N-acid acetil-neuraminic (CMP-NAN) este singurul zahăr-nucleotid monofosfat evidenţiat pînă acum în sisteme biologice, toate celelalte complexe conţinînd grupări difosfat. Derivaţii nucleotidici implicaţi în sinteza glicoproteinelor ar transporta nu monoze izolate, ci trizaharide deja constituite, cu secvenţa uridin-difosfo-N-acetil-glucozamină-galactoză-fucoză (sau acid sialic, în locul fucozei) [583].

Datele prezentate subliniază caracterul încă fragmentar al cunoştinţelor noastre asupra sintezei glicoproteinelor. Ansamblul reacţiilor, deja identificate sau încă ipotetice, sînt prezentate în *fig. 46.*

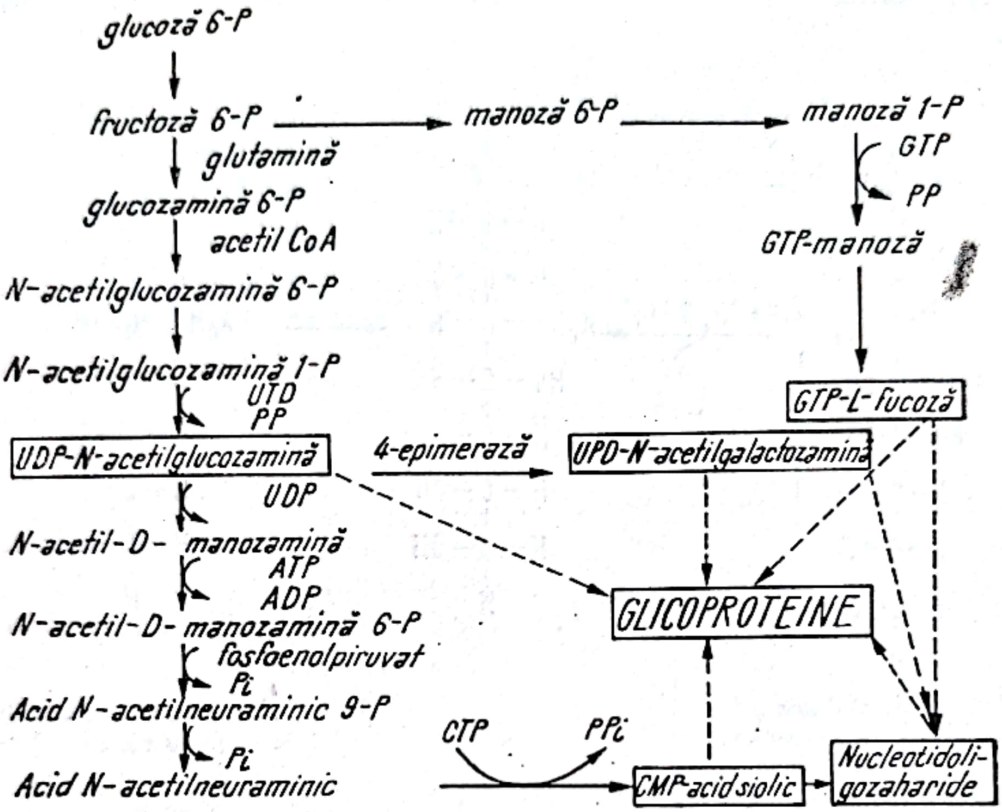


Fig. 46. Principalele etape în sinteza fracţiei glucidice a glicoproteinelor (—reacţii identificate; - - - reacţii probabile).

Aspecte celulare ale sintezei glicoproteinelor

Capacitatea fibroblaştilor de a sintetiza glicoproteine a fost sugerată o dată cu evidenţierea de granule PAS-reactive în citoplasma acestor celule. Cu ajutorul radioizotopilor s-a putut stabili că locul de elaborare a precursorilor glicoproteinei ar fi membranele reticulului endoplasmic. Aci, în perioada cînd lanţul polipeptidic este încă fixat pe ribozomi, are loc unirea fracţiei glucidice cu cea protidică, cel mai des prin intermediul unei legături asparaginil-N-acetilglucozamină [752]. Anumite celule mezenchimale care elaborează macromolecula constitutivă a membranelor bazale şi a fibrelor reticulinice, alcătuiesc agregate hibride, conţinînd glucide, proteine necolagene şi colagene [977]. Capacitatea de formare a unor astfel de agregate nu pare particulară omului şi nici chiar vertebratelor, întrucît la nevertebrate, colagenul este sintetizat de către celule sub forma unei glicoproteine, conţinutul glucidic depăşind uneori 20% din macromoleculă. Tot în legătură cu capacitatea fibroblaştilor de a sintetiza glicoproteine, menţionăm constatarea că în anumite medii

de cultură s-au găsit substanţe similare glicoproteinei alfa$_1$ acidă din ser [108]. Studii utilizînd glucozamină marcată, administrată în mediul de cultură al fibroblaştilor, au evidenţiat activitatea cea mai intensă la nivelul membranei ergastoplasmice [396]. Materialul radioactiv a apărut şi în ribozomii ergastoplasmei, şi în ribozomii liberi. Glucozamina care face legătura cu fracţia polipeptidică este, probabil, încorporată în perioada cînd lanţul proteic se găseşte încă fixat pe ribozomi [752], în timp ce, cea situată în poziţie mediană în lanţul glucidic este încorporată cînd glicopeptidul se găseşte la nivelul membranelor reticulului endoplasmic; hexozamina ce va da naştere manozaminei acidului sialic este încorporată cea din urmă, cînd glicoproteina a părăsit reticulul endoplasmic [396].

Condroblaştii şi osteoblaştii elaborează, de asemenea, glicoproteinele din constituţia matricelor cartilaginoasă şi osoasă. Aceste glicoproteine au fost implicate atît în procesul de inhibare, cît şi în cel de potenţare a mineralizării. Factorul de inhibare poate fi izolat ca o proteină-polizaharid, denumită P-PL 5. O cantitate de 0,107 g pe g de cartilaj uscat este prezentă, de exemplu, în cartilajul nazal de bou, dovedindu-se capabilă să inhibe depunerea în matricea cartilajului a 0,072 g de săruri de calciu [278]. Factorul de potenţare a mineralizării nu a fost izolat şi identificat sub aspect chimic. Se sugerează, însă, că glicoproteinele din matricea osteoidului ar avea capacitatea de a lega fosforul, în timp ce mucopolizaharidele acide ar capta calciul. Cînd ionii de calciu sînt în cantitate prea mare, exercită un efect inhibant asupra legării fosforului de către glicoproteine şi nu se mai poate forma fosfatul de calciu. Apariţia cristalelor de hidroxiapatită implică, iniţial, desulfatarea mucopolizaharidelor cu eliberarea calciului, care, ulterior, este legat de fosfatul fixat pe glicoproteine [113]. Astfel, raportul cantitativ dintre glicoproteinele şi mucopolizaharidele sintetizate de osteoblaşti, ar putea constitui un mecanism de reglare a intensităţii procesului de mineralizare.

Investigaţiile noastre asupra mastocitului au permis evidenţierea unui complex sialo-glico-lipoprotidic insolubil, a cărui reactivitate nu este modificată după eliminarea materialului cromotrop. Structura sa chimică variază de la o celulă la alta, în cadrul aceluiaşi organ [1100. 1106. 1131].

DEGRADARE

Cunoaşterea procesului de degradare a glicoproteinelor este de o mare importanţă în fiziologie şi fiziopatologie, el stînd la baza „dispariţiei" membranelor bazale în jurul celulelor neoplazice care încep să metastazeze, în focarele inflamatoare pe cale de necroză şi în glomerulii renali afectaţi în cursul anumitor procese patologice. În lumina aceloraşi date am putea înţelege mai uşor rezistenţa la degradare a variate glicoproteine, care rămîn în organism ca nişte corpi străini iritanţi.

Două mecanisme sînt de luat în considerare în catabolismul glicoproteinelor : 1) degradarea lanţului sau lanţurilor glucidice prin acţiunea

Scanned with OKEN Scanner

unor glucozidaze, specifice pentru fiecare unitate a lanţului respectiv ; 2) degradarea nucleului proteic, prin acţiunea diferitelor tipuri de proteaze. Dintre glucozidaze, vom analiza mai amănunţit efectele sialidazei, dată fiind importanţa acidului sialic în stabilitatea structurală şi activitatea biologică a glicoproteinelor.

Sialidaza (EC. 3.2.1.18)

Sub această denumire este definit un grup de glucozidaze, implicate în clivarea electivă a glicoproteinelor cu lanţuri terminale care conţin acid sialic. Activitatea enzimatică a fost constatată mai întîi în prezenţa virusului gripal, care determină aglutinarea reversibilă a hematiilor, ca o consecinţă a degradării receptorilor specifici pentru virus, situaţi la suprafaţa globulului roşu. Plecîndu-se de la această observaţie, s-a atribuit enzimei denumirea de *receptor destroying enzyme* [180]. Ulterior, au fost evidenţiate numeroase alte surse de enzimă : majoritatea virusurilor mixoide, *Vibrio cholerea*, *Clostridium perfringens*, pneumococul de tip II etc. S-a menţionat prezenţa fermenţilor şi în preparatele comerciale de glicoproteină umană [1164], ca şi în numeroase ţesuturi şi organe. Localizarea lizozomială sugerează participarea acestei enzime la procesele de autodigestie celulară, ca şi la degradarea materialului extracelular, susceptibil la respectiva cataliză [691].

Sialidaza este un ferment cu greutate moleculară redusă, de numai 10 000 — 20 000. Inactivarea prin căldură şi chimotripsină indică natura

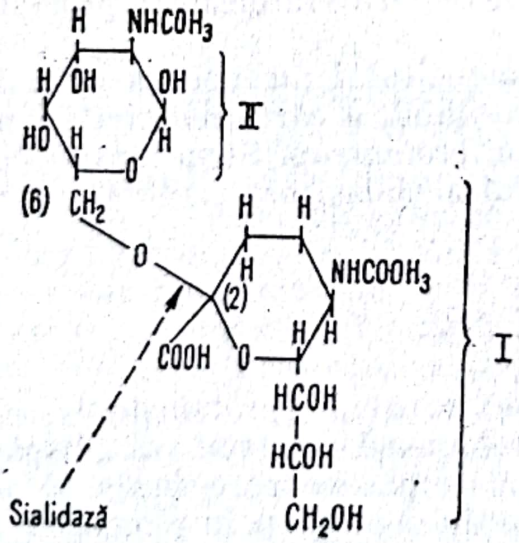


Fig. 47. Acţiunea sialidazei : clivarea legăturilor alfacetozice, determinînd liberarea acidului sialic situat la capătul terminal al lanţului glucidic al glicoproteinelor. I) acid sialic ; II) N-acetil glucozamină.

sa proteică. Acţionează ca o alfa-0-glucozidază, clivînd selectiv legăturile alfa-cetozice (*fig. 47*). Aceste legături unesc gruparea 2-ceto a acidului sialic de hidroxilul de la C_6 al N-acetilgalactozaminei, sau hidroxilul de la C_3 al galactozei [400; 401].

Scanned with OKEN Scanner

Dacă acidul sialic este legat în configuraţie *cis* faţă de un alt substituent din aceeaşi moleculă de galactoză [602], sau dacă a suferit o acetilare în poziţia 7, apare rezistenţa la sialidază [313].

Proteazele

Pepsina (EC. 3.4.4.1) pare a cliva un număr limitat de legături endopeptidice din lanţul proteic al glicoproteinelor, determinînd apariţia de fragmente de macromoleculă. Digestia nu avansează însă pînă la produşi dializabili.

Tripsina (EC.3.4.4.4) produce, de asemenea, fragmentarea macromoleculelor de glicoproteine, diminuînd de aproximativ 10 ori greutatea lor moleculară. Ea acţionează în special pe legăturile peptidice de la nivelul grupărilor carboxilice ale aminoacizilor bazici, lizina şi arginina. De remarcat că efectul tripsinei asupra glicoproteinelor este redus la aproximativ 1/3 din numărul legăturilor susceptibile să fie atacate, dacă la periferia lanţului glucidic al respectivei macromolecule se găseşte acidul sialic [402].

Scanned with OKEN Scanner

MODIFICĂRILE ORGANIZĂRII MACROMOLECULARE A ŢESUTULUI CONJUNCTIV DETERMINATE DE ÎMBĂTRÎNIREA ORGANISMULUI

INTRODUCERE

De ce mortalitatea şi morbiditatea devin mai frecvente cu cît vîrsta este mai înaintată?

Reprezintă oare bătrîneţea începutul manifestării clinice a unor boli care duc inevitabil la exitus, sau reprezintă o etapă a evoluţiei ontogenetice peste care se suprapun cronologic bolile respective?

Pentru ce bătrînii mor cînd fac afecţiuni care la tineri nu pun probleme medicale greu de rezolvat?

Ce se modifică în organism o dată cu înaintarea în vîrstă spre a întîlni, cu atîta frecvenţă la bătrîneţe, scleroze vasculare şi cerebrale, osteoporoze, osteoartroze, fibromiozite, cataracte, otoscleroze, emfizem şi alte „infirmităţi" ale vîrstei înaintate?

Aceste întrebări, care au frămîntat pe oamenii de ştiinţă secole de-a rîndul, încep să capete anumite răspunsuri în lumina rezultatelor cercetărilor efectuate cu metodele moderne de investigaţie. O mare parte a acestor cercetări au avut ca subiect dinamica organizării macromoleculare a ţesutului conjuctiv, în cursul evoluţiei ontogenetice.

*

Spre a da un exemplu demonstrativ asupra interrelaţiilor dintre înaintarea în vîrstă şi creşterea mortalităţii, menţionăm o investigaţie efectuată de *National Office of Vital Statistics* din Statele Unite ale Americii [586]. Cercetînd curbele mortalităţii la 16 dintre bolile (sau categoriile de boli) larg răspîndite s-a putut constata că:

— aceste curbe devin logaritmice pentru toate bolile care duc la exitus, după ce a fost depăşită vîrsta de 30 de ani;

— tot după vîrsta de 30 de ani, probabilitatea morţii se dublează la fiecare 8 ani de viaţă.

Aceiaşi statistică lasă să se întrevadă că, dacă marele număr de decese prin accidente cardiace şi cerebrale datorite aterosclerozei ar putea fi prevenite, media noastră de viaţă ar creşte cu aproximativ încă 7 ani.

Cercetările, extrem de numeroase, efectuate în special în cursul ultimului deceniu, cu utilizarea celor mai multilaterale şi mai moderne me-

tode de investigație au demonstrat că îmbătrînirea organismului afectează procesele metabolice de bază ale parenchimurilor și țesuturilor, modificînd funcțiile celulelor și diminuînd eficiența mecanismelor de homeostazie.

Pe plan general, aceste alterări sînt reflectate de scăderea rezistenței organismului față de variați factori de mediu, ceea ce ar explica, de exemplu, creșterea cu vîrsta a mortalității prin infecții. Această scădere a rezistenței este determinată de modificările reglării neuroendocrine, a circulației sistemice, a metabolismelor parenchimurilor, a celulelor imunologic competente etc. Discutarea acestor dereglări funcționale depășește subiectul monografiei.

Pe plan celular s-a risipit multă energie în încercările de a evalua importanța, în procesul de îmbătrînire, a acumulărilor intracelulare de așa-zise molecule „nelabile", care apar în special sub aspectul unor pigmenți, în sistemul nervos central, miocard și ficat. Datorită însă capacității de regenerare a celulelor, precum și faptului că se poate trăi, de exemplu, cu mai puțin de jumătate din ficat sau cu un singur rinichi sau plămîn, determinarea uzurii pentru fiecare celulă în parte și pentru organ în totalitate rămîne o problemă încă greu de rezolvat.

O perspectivă nouă de studiu în acest domeniu l-a adus evidențierea mecanismului de îmbătrînire a țesutului conjunctiv. Cercetările efectuate pînă acum permit, pentru prima dată în biologie și medicină, să se treacă de la afirmații cu caracter general (ca acelea care susțin că bătrînețea rezultă din acumulări de *stress*-uri psihice și dezechilibre endocrine), la demonstrarea științifică a transformărilor care au loc la nivelul macromoleculelor.

Scanned with OKEN Scanner

TEORIA EXCESULUI DE CONECTĂRI INTERMOLECULARE

Monomerii macromoleculei de colagen, reprezentaţi de lanţurile polipeptidice denumite alfa$_1$ şi alfa$_2$, se unesc în dimerii beta, iar, din interconectarea dimerilor, iau naştere trimerii gamma, respectiv forma completă a macromoleculei. Însfîrşit, legăturile care se stabilesc între trimeri vor uni, una de alta, macromoleculele, rezultînd filamente, fibrile şi fibre. Aceste conectări intermoleculare asigură „normostabilitatea" fiecărui tip de ţesut conjunctiv în parte, numărul lor variind după particularităţile funcţionale, metabolice şi mecanice ale fibrelor. Astfel, se întîlnesc mai multe legături intermoleculare în fibrele din tendoane, în comparaţie cu cele din capsulele organelor şi în cele din capsulele organelor, în comparaţie cu ţesutul lax.

Procesul de „îmbătrînire" a macromoleculei de colagen s-ar caracteriza, în primul rînd, printr-o creştere peste normal a numărului legăturilor intermoleculare, creştere care nu este solicitată de factori mecanici suplimentari, ci apare ca rezultat al unor modificări metabolice de lungă durată. Normostabilitatea este astfel treptat convertită în hiperstabilitate, rezultînd şi o modificare a capacităţii funcţionale a fibrelor, precum şi a interrelaţiilor dintre fibră şi substanţa fundamentală ce o înconjoară.

Condiţiile care favorizează „îmbătrînirea" sînt creiate de dispariţia turnoverului metabolic la marea majoritate a macromoleculelor de colagen incluse în fibre, împiedicîndu-se astfel reînoirea şi remodelarea unităţilor constitutive ale macromoleculei. Devenită inertă din punct de vedere metabolic, macromolecula de colagen ar fi supusă acţiunii unor agenţi chimici sau produşi intermediari de metabolism, care induc sau participă direct la formarea de noi legături intermoleculare. Astfel s-ar produce, în tot cursul vieţii, un proces lent de interconectare macromoleculară, asemănător, pînă la un anumit punct, celui din taninizarea industrială a pieilor, proces ce ar antrena apariţia unei patologii a vîrstei înaintate.

Se acceptă în general că proprietăţile polimerilor sînt strîns legate de numărul, distribuţia şi tipul interconectărilor lanţurilor constitutive. Creşterea numărului legăturilor intermoleculare duce, în mod inevitabil, la o densificare a stării solide, la reducerea spaţiului dintre lanţurile polipeptidice şi dintre macromolecule, precum şi la blocarea reactivităţii grupărilor implicate în aceste legături. Rezultă o scădere a volumului specific, a capacităţii de hidratare, a reactivităţii chimice, a posibilităţii de pătrundere a solvenţilor, asociate cu o creştere a rezistenţei mecanice.

Scanned with OKEN Scanner

Toate aceste modificări ar caracteriza „îmbătrînirea" macromoleculei de colagen.

Testul cel mai des utilizat pentru a măsura „vîrsta biologică" a fibrelor țesutului conjunctiv este contracția termică. Scurtarea fibrelor sub acțiunea căldurii a fost observată cu un secol în urmă, fiind ulterior larg cercetată pe plan experimental. S-a constatat, de exemplu, că dacă se încălzește un fragment de tendon la 58°C, se scurtează cu aproximativ 1/4 din lungimea inițială. În același timp, macromoleculele constitutive ale fibrelor de colagen își pierd dispoziția helicoidală a lanțurilor polipeptidice, tendonul în întregime devenind mai transparent, mai sticlos și dotat cu o elasticitate asemănătoare cauciucului. După un anumit timp, fragmentul contractat se reîntinde, proces denumit relaxare, iar, la o nouă încălzire, apare ruperea fibrelor. Se poate sugera că, prin procesul de încălzire se produce o denaturare a macromoleculei de colagen, cu alterarea structurii sale terțiare, cea care îi asigură particularitatea biologică fundamentală, inextensibilitatea. Denaturarea rezultă prin ruperea legăturilor intra- și intermoleculare, permițînd fibrei să se contracte, deci să devină elastică. Dacă denaturarea progresează, sînt scindate și legăturile covalente (cele mai rezistente) și apare relaxarea fibrei, care însă nu mai rezistă la tracțiuni mecanice și se rupe ușor la prima solicitare.

Stabilindu-se un patern al contracției, în funcție de temperatură și de timp pentru același tip de fibre, s-a putut analiza forța contracției, care pare să crească proporțional cu numărul legăturilor intermoleculare. Metoda cea mai utilizată pentru această analiză o constituie atîrnarea unor greutăți la capătul liber al fragmentului de tendon și urmărirea intensității contracției, în raport cu valoarea greutății. S-a constatat că mărimea greutății ce poate bloca contracția termică variază net cu vîrsta biologică a animalului. Astfel, pentru a se bloca 50% din contracție, este necesară o greutate medie de 1 g la șobolanul de 3 luni și de 3,9 g, la șobolanul de 18 luni [1145]. Un alt factor care a putut fi corelat cu vîrsta biologică este temperatura la care apare contracția. Exemplificînd tot cu fibrele de colagen din tendonul cozii de șobolan, contracția este de 20% la 58°C în decurs de 7 minute la animalul de 5 luni și de 70%, la aceiași temperatură și în același interval de timp, la animalul de 2 ani [1145].

Variatele experimente efectuate în acest domeniu au dus la concluzia că „vîrsta" macromoleculei de colagen ar putea fi testată pe baza următoarelor criterii:

— greutatea necesară pentru a împiedica contracția termică în cursul unei încălziri progresive, de exemplu de 2°C pe minut;

— greutatea necesară pentru a împiedica să se producă 50% din contracția termică, care ar apare în lipsa greutății, în cursul aceleiași încălziri progresive;

— temperatura la care începe contracția;

— temperatura la care contracția este maximă;

— perioada necesară apariției relaxării după contracția maximă;

— viteza relaxării;

Scanned with OKEN Scanner

— temperatura în momentul cînd fibrele se rup sub acţiunea greutăţii care împiedică total contracţia.

S-a mai constatat că fibrele de colagen de la animalele tinere se pot relaxa dacă au anexate greutăţi mici, pe cînd cele de la animalele bătrîne necesită, pentru a se relaxa, greutăţi mai mari. În plus, acest proces ar mai fi influenţat şi de starea nutriţională a animalului, şobolanii subnutriţi, în vîrstă de 165—200 de zile, prezentînd aceiaşi „constantă" de relaxare ca şi cei în vîrstă de 60 de zile, dar hrăniţi în condiţii adecvate. Reechilibrarea regimului alimentar la animalele subnutrite face să apară şi diferenţa între constantele de relaxare legate de vîrsta biologică. S-a putut astfel afirma că paternul macromoleculelor de colagen din ţesutul conjunctiv al animalelor subnutrite este mai „tînăr", decît al celor normal alimentate [210]. Pe de altă parte, dacă se instituie un regim de supraalimentare, sau bogat în colesterol, ca cel utilizat pentru producerea aterosclerozei experimentale, apare o „îmbătrînire" precoce a colagenului din variate ţesuturi şi organe [507].

În legătură cu procesul de contracţie termică ar mai fi de menţionat următoarele observaţii de care trebuie să se ţină seamă cînd se utilizează această metodă de evidenţiere a „îmbătrînirii" colagenului din fibre:

— o fibră contractată, cu legături intermoleculare rupte, cu dispariţia triplului helix şi cu o orientare întîmplătoare a lanţurilor polipeptidice din macromolecula de colagen, devine extensibilă, putînd fi alungită artificial pînă la dimensiunile iniţiale, dar se recontractă imediat ce tracţiunea încetează; acest proces poate fi repetat de mai multe ori, în condiţiile menţinerii temperaturii de contracţie;

— dacă se coboară temperatura la 20°C după ce fibra a fost alungită, ea rămîne alungită, pierzînd capacităţile elastice; reîncălzită la temperatura de contracţie se scurtează din nou, redevenind elastică;

— o fibră contractată, menţinută la temperatura la care a apărut contracţia, are capacitatea de a se relaxa spontan, revenind la lungimea iniţială, dar nu mai prezintă ulterior nici proprietăţi elastice, nici contracţie termică; încălzită din nou, se va rupe sub tracţiunea celor mai mici greutăţi. După cum am mai menţionat, aceste modificări funcţionale ţin de tipul şi numărul legăturilor inter- şi intramoleculare care sînt rupte în cursul acestor variate procedee experimentale [1145].

Testul contracţiei termice, reflectînd modificările de vîrstă ale capacităţilor mecanice ale fibrei de colagen, a fost ulterior completat cu determinarea chimică a hidroxiprolinei, eliberate în cursul procesului de contracţie. Analizele efectuate au permis să se constate că macromoleculele din fibrele animalului tînăr eliberează rapid o cantitate mai mare de hidroxiprolină în cursul contracţiei termice, în comparaţie cu animalul bătrîn. Astfel, din tendonul de şobolan de 1—3 luni s-a eliminat 75—90 % din hidroxiprolina totală, iar la cel de 30—36 de luni, doar aproximativ 25%. A rămas astfel o fracţie de numai 10—25% a hidroxiprolinei în colagenul insolubil al animalului tînăr şi de aproximativ 75%,

Scanned with OKEN Scanner

în colagenul insolubil al animalului bătrîn [1146]. Rezultate demonstrative au fost obținute și din analiza contracției termice a colagenului din pielea de bovine. La animalul în vîrstă de 1—3 luni s-a eliberat în cursul contracției termice a fibrelor 11,81 % din colagenul total, la cel în vîrstă de 1 an 2,96%, la cel între 2 și 7 ani 0,68%, iar la cel între 8 și 12 ani, 0,35%. În mușchiul scheletic, contractarea fibrelor de colagen la 65°C, timp de 10 minute, liberează 40% din colagenul total la animalul de 1—2 luni, 10% la șobolanul de 10 luni și 3—4% la cel de 30—40 de luni [1145]. Se consideră că, în toate țesuturile, eliberarea hidroxiprolinei sub acțiunea contracției termice rezultă prin același mecanism, și anume prin ruperea legăturilor inter- și intramoleculare, în special a punților de hidrogen asupra cărora acționează, în primul rînd, creșterea temperaturii. Cu cît vîrsta animalului este mai înaintată și numărul de punți de hidrogen din macromolecule mai numeroase, liberarea de hidroxiprolină sau de colagen solubil devine din ce în ce mai redusă.

Pe plan clinic, posibilitatea înmulțirii progresive a legăturilor intermoleculare în fibrele de colagen prin acțiunile unor agenți metabolici a fost sugerată de studiul alcaptonuriilor. La bolnavii cu un defect ereditar în metabolismul tirozinei, se acumulează în organism acidul homogentizinic, care are capacitatea de a interconecta lanțurile polipeptidice dintre două macromolecule de colagen alăturate, întărind astfel în mod nefiziologic stabilitatea structurală a fibrelor, proces reflectat prin apariția de numeroase scleroze viscerale [130,131]. Reacția colagenului cu monomerul neoxidat al acestui acid pare a fi rapid reversibilă. Dacă însă acidul homogentizinic a suferit o oxidare, iau naștere polimeri care se leagă ireversibil de lanțurile polipeptidice ale macromoleculei de colagen, conectînd astfel indirect macromoleculele între ele. Prezența acestei forme oxidate este relevată de pigmentația caracteristică a cartilagiilor, a tendoanelor și a altor teritorii ale țesutului conjunctiv unde s-a acumulat acidul homogentizinic. Se consideră că în aceste zone se produce, *in vivo*, un proces similar celui din taninizarea industrială a pieilor.

Plecîndu-se de la aceste constatări, s-a investigat dacă nu există, și în condiții fiziologice, astfel de agenți, capabili să producă „îmbătrînirea" macromoleculelor din fibrele de colagen. Dintre sutele de substanțe care au fost testate pînă acum, numai aldehidele alifatice s-au dovedit capabile, *in vitro*, să interconecteze macromoleculele din fibre. Toți ceilalți nenumărați intermediari ai metabolismului glucidelor, protidelor și lipidelor au apărut ineficienți din acest punct de vedere, cel puțin în condițiile de testare respective.

Investigații analitice au demonstrat că, pentru a „îmbătrîni" macromolecula de colagen, ca urmare a creșterii anormale a numărului legăturilor intermoleculare, produsul de metabolism intermediar trebuie să posede, în afara grupării aldehidice, următoarele particularități sterice și chimice:

— un grup formil terminal;

— o substituţie care să atragă electroni la nivelul carbonului alfa (tip C = C; CHOH; C = O);

— atomul de carbon alfa să fie legat de un lanţ alifatic care să nu posede mai mult de 1—2 atomi de carbon adiţionali;

— să existe un atom de hidrogen terminal [736].

Spre a putea pătrunde prin spaţiul extrem de redus ce există între două lanţuri polipeptidice ale macromoleculei de colagen, agentul producător de legături intermoleculare trebuie să posede o configuraţie sterică extrem de simplă, respectiv cel mult 4 atomi de carbon sau, în total, 6—7 Å. Substituirea lanţului alifatic printr-un nucleu aromatic a dus, în mod constant, la pierderea capacităţii de a forma legături intermoleculare.

Pe baza datelor menţionate sînt de luat în considerare, ca agenţi potenţiali de îmbătrînire a macromoleculelor din fibrele de colagen: aldehida glicerică şi aldehida piruvică din metabolismul glucidic; aldehida glicolică din metabolismul protidic; acroleina şi aldehida crotonică din metabolismul lipidic [737]. S-au mai incriminat şi anumiţi derivaţi dialdehidici din ciclul Krebs, care pot acţiona numai dacă au două grupări formil terminale şi un lanţ alifatic. Menţionăm, de asemenea, un anumit interes acordat chinonelor, considerate capabile să producă legături încrucişate, mai rezistente decît cele rezultate din acţiunea aldehidelor. Astfel, benzochinona şi substanţe înrudite, sînt capabile să determine *in vitro* nuclei rapizi de precipitare a colagenului în soluţie [1073].

Mecanismul intim de acţiune a agenţilor producători de legături încrucişate intermoleculare este doar în parte elucidat. Studii analitice efectuate în acest domeniu au evidenţiat, mai întîi, apariţia unui derivat aminometilol (—NH—CH_2—OH) al aminelor primare sau secundare. Se formează, astfel, un grup OH extrem de reactiv, apt să reacţioneze rapid cu un alt grup care conţine un atom de hidrogen activ. Apa este eliminată în cursul acestei reacţii şi ia naştere o punte metilenică (R—NH—CH_2—NH—R'). Compuşii ce rezultă ca urmare a formării acestui tip de legătură intermoleculară se caracterizează printr-o mare rezistenţă la *stress*-uri mecanice şi la acţiunea enzimelor, agenţilor chimici, căldurii. Dialdehidele pot forma atît punţi de metilen intermoleculare, cît şi baze Schiff intramoleculare, la ambele capete ale moleculei. În acest caz grupul formil de la un capăt reacţionează cu un grup amino dintr-un lanţ polipeptidic, în timp ce capătul opus al metabolitului intermediar se leagă de un grup amino al altui lanţ polipeptidic. Se formează astfel o legătură intermoleculară, rezultînd un complex cu următoarea structură generală: $R_1N{=}C{-}R_0{-}C{=}NR_2$. Grupele cele mai reactive ale colagenului pentru astfel de reacţii ar fi cele epsilon-amino al lizinei şi cele cetoimidice. În plus, a fost implicat şi radicalul amino al hidroxilizinei, argininei, glutaminei, asparaginei, precum şi radicalul hidroxil al hidroxiprolinei [736, 737]. Recent, s-a mai evidenţiat un compus ninhidrin-pozitiv, cu particularităţile cromatografice ale epsilon-N-metilhidroxilizinei, care a fost implicat, de asemenea, în formarea legăturilor intermoleculare [267].

Scanned with OKEN Scanner

Se sugerează că acest proces de „taninizare" *in vivo* a colagenului s-ar desfăşura în două etape : prima, ar fi o modificare intramoleculară, cu ruperea legăturilor dintre lanţurile polipeptidice de către metaboliţii aldehidici, urmată de liberarea grupelor reactive ; a doua, s-ar limita la formarea legăturilor intermoleculare. Intensitatea acestui proces este dominată nu numai de cantitatea de metabolit intermediar şi de numărul grupelor reactive ale colagenului, ci şi de densitatea legăturilor intra- şi intermoleculare preexistente şi, probabil, de starea de polimerizare a substanţei fundamentale interfibrilare. Totuşi, în anumite condiţii, factorul cantitate devine predominant, aşa cum se întîmplă, de exemplu, în diabetul necontrolat şi netratat în care abundenţa de corpi cetogeni duce la „îmbătrînirea" rapidă a numeroase macromolecule de colagen, explicînd frecvenţa apariţiei sclerozelor vasculare, renale, oculare etc. [131]. Pe baza aceluiaş proces, legat de anumite particularităţi metabolice, se încearcă să se explice şi unele deosebiri în ritmul de îmbătrînire a diferitelor specii, precum şi durata mai lungă sau mai scurtă a mediei de viaţă. Tot pe baza procesului de interconectare a macromoleculelor de colagen prin agenţi de formare a legăturilor intermoleculare, se încearcă să se explice alterările de vîrstă ale ţesutului conjunctiv, reflectate prin tendinţa continuă la deshidratare, prin fragmentarea fibrelor colagene şi elastice, prin aşa-zisa colagenizare a reticulinei şi a membranelor bazale, prin reducerea cantitativă a substanţei fundamentale şi creşterea raportului colagen/mucopolizaharide acide, şi, însfîrşit, prin reducerea progresivă a susceptibilităţii la colagenază a fibrelor de colagen. După aproape 15 ani de la demonstrarea interrelaţiilor dintre vîrsta biologică şi capacitatea de contracţie termică a colagenului [1143], această metodă a permis acumularea a numeroase date experimentale care încearcă să demonstreze că înmulţirea legăturilor intermoleculare reprezintă mecanismul fundamental al „îmbătrînirii" macromoleculelor de colagen din fibre.

TEORIA RETRACŢIEI TERMODINAMICE SPONTANE

O linie mai nouă de investigaţie corelează procesul de „îmbătrînire" a macromoleculelor de colagen, cu retracţia termodinamică spontană a lanţurilor polipeptidice [319]. Conform acestei teorii, „îmbătrînirea" ar rezulta nu din acţiunea întîmplătoare a unor produşi intermediari de metabolism, ci datorită unor modificări structurale ce au loc în interiorul macromoleculei, determinate de tendinţa de retracţie a fiecărui biopolimer în direcţia minimei energii libere. În cazul macromoleculei de colagen, aceste modificări structurale au loc în zona cea mai puţin ordonată a macromoleculei, respectiv în lanţurile scurte, bogate în aminoacizi polari, situate la capetele triplului helix. Retracţia din aceste zone amorfe se însoţeşte de o mărire a cristalinităţii în zonele bogate în aminoacizi apolari, evidenţiabilă prin metode difractometrice. Astfel, la embrionul de şobolan, macromolecula de colagen este cristalină doar în proporţie de

Scanned with OKEN Scanner

9,1%, pe cînd la animalul adult, cristalinitatea creşte la 18,1%[319]. În cursul acestui proces de retracţie spontană, dependent ca intensitate de lungimea şi numărul lanţurilor telopeptidice din zonele periferice ale fiecărei macromolecule de colagen, apar următoarele modificări mai importante: *a*) apropierea grupelor reactive ale lanţurilor polipeptidice la distanţe care permit interconectarea lor directă, rezultînd noi legături intermoleculare; *b*) eliminarea apei dintre lanţurile polipeptidice care se apropie; *c*) creşterea rigidităţii macromoleculelor.

Apropierea grupelor reactive ale lanţurilor polipeptidice din două macromolecule de colagen alăturate, la distanţe care permit formarea de legături directe intermoleculare, reprezintă un proces care a fost prea puţin analizat pînă acum. S-a calculat că atunci cînd apar aceste apropieri, parametrii termodinamici sînt favorabili în special pentru formarea de punţi de hidrogen, care necesită o energie liberă de aproximativ 0,6 Kcal/mol, la 27°C[951]. Faptul că procesul de contracţie termică a fibrelor de colagen, utilizat atît de mult ca test al densităţii legăturilor intermoleculare, are loc la temperaturi progresiv ridicate cu cît organismul este mai bătrîn, poate pleda atît pentru acţiunea menţionată a agenţilor rezultaţi din metabolismul intermediar, cît şi pentru formarea de noi punţi de hidrogen, prin creşterea gradului de cristalinitate a macromoleculelor. Grupul cel mai des implicat în apariţia acestor interconectări (ca rezultat al retracţiei termodinamice) ar fi hidroxilul hidroxiprolinei. În sprijinul acestei supoziţii ar pleda observaţia că procesul de contracţie termică se produce la o temperatură cu atît mai ridicată, cu cît conţinutul în hidroxiprolină a colagenului este mai mare[433].

Scăderea gradului de hidratare a fibrelor, constituie un al doilea rezultat important al procesului de retracţie spontană de origină termodinamică, în direcţia minimei energii libere. Suprafeţele macromoleculelor de colagen influenţează structura apei din vecinătatea lor imediată, două efecte principale fiind de luat în considerare: *a*) lanţurile laterale polare se hidratează determinînd o modificare structurală a straturilor adiacente ale apei; *b*) lanţurile centrale apolare induc în apă o ordine moleculară asemănătoare cu aceea din propria lor macromoleculă[107]. Această „structuralizare" a apei rezultă din existenţa unor grupări libere, apte să formeze punţi de hidrogen care, în macromolecula de colagen se repetă, la distanţă fixă de 28,6 Å, distanţă ce reprezintă exact spaţiul ocupat de 6 molecule de apă. Prin aceste legături, apa este fixată de macromolecula de colagen la fiecare 28,6 Å, fiind stabilizată de-a lungul lanţurilor polipeptidice. Faptul că grupările libere, apte să dea naştere la punţi de hidrogen, sînt aşezate perpendicular pe triplul helix, reprezintă o poziţie sterică favorabilă pentru a face interconectări cu moleculele de apă, dispuse tot perpendicular pe direcţia longitudinală a fibrelor. În condiţiile evacuării moleculelor de apă dintre lanţurile polipeptidice, ca urmare a apropierii tot mai strînse a acestor lanţuri în cursul procesului de retracţie termodinamică spontană, grupele N—H şi C=O ale macromoleculei de colagen, care formau punţi de hidrogen cu moleculele de apă, rămîn libere. Dacă lanţurile polipeptidice se apropie

Scanned with OKEN Scanner

sub 5 Å, aceste grupe creiază punți de hidrogen de la un lanț la altul, mărind astfel densitatea legăturilor intermoleculare. De aceea, prezența apei între lanțurile polipeptidice ale aceleiași macromolecule și ale unor macromolecule alăturate, constituie un factor de reglare, prin acțiuni competitive, a numărului de grupe libere, apte să formeze punți de hidrogen. Dispariția ei creiază astfel condițiile „îmbătrînirii" macromoleculelor, prin favorizarea formării unui număr anormal de mare de legături intermoleculare.

Creșterea rigidității macromoleculelor, a treia modificare importantă ce rezultă din procesul de retracție spontană de origină termodinamică, este rezultatul măririi gradului de cristalinitate în zona macromoleculei de colagen dominată de aminoacizii apolari. Cîștigînd un plus de rezistență la *stress*-uri mecanice, fibra care conține aceste macromolecule devine mai puțin adaptabilă la interacțiunile cu mediul înconjurător, mai ales în ceea ce privește variațiile de pH și de concentrație ionică. În special coborîrea pH-ului local ar fi urmată de dispariția cristalinității și de transformarea macromoleculei într-o masă amorfă, rezultînd pierderea capacităților mecanice ale fibrelor. Această alterare ar apare mai ales în zonele supuse la *stress*-uri repetate, cum ar fi valvulele cardiace, cordajele tendoanelor, capsulele articulațiilor, pereții arterelor. De asemenea, unele molecule mici, de tipul bazelor și acizilor slabi, pot acționa în același sens, de degradare a structurii cristaline. Se încearcă, astfel, să se explice numeroase leziuni cu caracter distructiv, care se suprapun cronologic cu procesul de îmbătrînire a organismului. Ele sînt reflectate clinic prin apariția osteoporozei, osteoartozelor, pielii senile, emfizemului etc.

Un alt factor care poate fi implicat în „îmbătrînirea" macromoleculelor din fibrele de colagen sînt iradiațiile.

Pe primul plan trebuie luate în considerare efectele razelor ultraviolete, dată fiind expunerea organismului la lumina solară. Cercetările în acest domeniu tind să demonstreze că efectul de „îmbătrînire" s-ar produce prin apariția de metaboliți intermediari, dotați cu capacitatea de interconectare a lanțurilor polipeptidice. Anumite rezultate atrag atenția asupra rolului lipidelor nesaturate care, sub acțiunea razelor ultraviolete, dau naștere la produși de oxidare bogați în grupări aldehidice, care „taninizează", în special, colagenul din pielea expusă razelor solare[132].

Pe plan secundar, o anumită atenție trebuie acordată și efectelor razelor X, deși nu cunoaștem încă potențialul lor de interconectare a lanțurilor polipeptidice, în condițiile acțiunii unor doze extrem de mici și pe durate de timp extrem de lungi (mai multe decenii). În clinică însă, frecvența sclerozelor postradioterapice este bine cunoscută și are o incontestabilă valoare științifică. Efectele de interconectare a macromoleculelor, care determină apariția sclerozei apar cu atît mai nete, cu cît țesutul conjunctiv respectiv conține fibre cu macromolecule mai sărace în legături intermoleculare și cu cît durata iradierii se prelungește pe un timp mai îndelungat. S-a putut demonstra experimental, că o singură iradiație poate mări de 36 de ori numărul de legături intermoleculare și intramoleculare ale unei macromolecule de colagen cu o greutate de apro-

Scanned with OKEN Scanner

ximativ 360 000 [46]. Ca urmare a acestui proces, tendonul devine rigid, fiind alcătuit din fibre conținînd macromolecule cu un înalt grad de cristalinitate. Efectul iradiațiilor apare numai dacă tendonul este intens îmbibat cu apă. Dimpotrivă, pe un tendon uscat, aceiași cantitate de raze X determină o degradare masivă a fibrelor; se sugerează astfel că, pe lîngă efectul direct produs de trecerea electronilor, în procesul de „îmbătrînire" a macromoleculelor de colagen intervine hotărîtor energia primită prin transfer de la procesul de radioliză a apei. Deși necesitatea prezenței apei, pentru apariția legăturilor intermoleculare induse prin raze X a apărut constant în toate cercetările, mecanismul intim al acestui proces este încă puțin studiat. S-au sugerat: reagregări ale macromoleculelor cu formarea de noi punți de hidrogen; apariția de legături covalente între rezidii aromatice de tipul tirozinei și fenilalaninei; conectări de tip C—C la nivelul aminoacizilor polari din zonele amorfe ale macromoleculei de colagen etc [48].

★

Existența unui mecanism de „îmbătrînire" a macromoleculei de colagen prin înmulțirea legăturilor intermoleculare este o realitate științifică bine documentată, mai ales pe plan experimental. Pare însă surprinzătoare ușurința cu care anumiți autori reduc o problemă atît de complexă pe plan biologic, ca aceea a îmbătrînirii organismului, la o simplă creștere numerică a legăturilor intermoleculare, fapt constatat aproape în exclusivitate la nivelul tendonului cozii de șobolan. De aceea nu este de mirare că s-au propus teste de apreciere a gradului de îmbătrînire a organismului în întregime, prin simpla constatare a rezistenței la solubilizare a fibrei de colagen, rezistență ce crește paralel cu numărul legăturilor intermoleculare. Tot în același sens s-a propus evidențierea raportului cantitativ între monomerii alfa și dimerii beta, raport ce scade paralel cu înmulțirea interconectărilor.

Fără a diminua valoarea cercetărilor care încearcă să demonstreze că molecula de colagen „îmbătrînește", considerăm, ca și alți autori [214], că procesul complex de îmbătrînire a organismului nu poate fi atît de mult simplificat, încît să îl considerăm rezultatul acțiunii întîmplătoare a unui *by-product* al ciclului Krebs sau al altui ciclu metabolic. Perioada de senescență rezultă din acumularea îndelungată a numeroase insulte, acționînd atît asupra celulelor, cît și asupra spațiilor extracelulare, și care duc, în timp, la alterarea funcțională a organelor și țesuturilor. În acest proces complex, acumularea de macromolecule inerte din punct de vedere metabolic, atît în celule, cît și în afara lor, reprezintă unul dintre mecanismele care merită să rețină atenția cercetătorilor. La aceasta se adaugă scăderea intensității oxigenării țesuturilor, blocarea eliminării unor produși de metabolism, anumite insuficiențe hormonale, anumite alterări în metabolismul sistemului nervos central etc. La nivelul macromoleculelor sînt de luat în considerare nu numai înmulțirea legăturilor inter și intramoleculare, ci și variate procese de dezaminare și decarboxi-

Scanned with OKEN Scanner

lare, amidări, reduceri ale punților disulfidice, oxidări de radicali sulfhidril, deplisări ale spiralelor polipeptidice [1163], creșteri ale greutăților macromoleculare [38] și numaroase alte modificări care intră în conversiunea normostabilității, în hiper-sau hipostabilitate structurală.

Pentru a demonstra și mai evident complexitatea procesului de îmbătrînire, menționăm că energia de activare necesară orientării liniare a macromoleculelor de colagen și formării de fibre este mai mică la bătrîni (11—15 Kcal), în comparație cu tinerii (28—30 Kcal), sugerînd și alterări în capacitatea de agregare a macromoleculelor [786]. Pe aceeași linie de cercetare s-a demonstrat că, în prezența condroitin-sulfatului de tip A și a proteinelor plasmatice, colagenul în soluție, extras de la un animal bătrîn, precipită fibrilar mult mai repede, decît cel obținut de la animalul tînăr. În schimb, colagenul de la animalul bătrîn apare mai susceptibil la factori de degradare, aceiași încălzire a soluției întîrziind mult mai mult precipitarea fibrilară a colagenului bătrîn, în comparație cu cel tînăr [786]. Toate aceste rezultate subliniază complexitatea mecanismelor ce modifică macromolecula de colagen o dată cu înaintarea în vîrstă, făcînd-o mai puțin aptă să se adapteze microtraumatismelor incluse în procesul normal al evoluției ontogenetice. De aceea, cu toată aparenta creștere a numărului de legături intermoleculare, cu toată rezistența progresiv mărită la digestia cu colagenază și cu toată ridicarea progresivă a gradului de insolubilizare, colagenul de la omul bătrîn nu are rezistența mecanică a celui apărut în sclerozele difuze ale organelor, determinate de procese patologice. Așa ne putem explica de ce predomină catabolismul oaselor, reflectat de osteoporoza senilă, de ce este atît de intens degradat colagenul din cartilajele articulare, apărînd osteoartrozele, de ce se subțiază dermul la bătrîni, apărînd așa-zisa piele senilă. Am mai putea amplifica datele prezentate, cu rupturile spontane ale inelului fibros al discului intervertebral, cu necrozele aseptice de la nivelul capului femurului sau al humerusului, cu fracturile de „oboseală" ale peroneului, cu colapsul vertebral, cu rupturile spontane ale tendonului Achile și ale cvadricepsului etc., toate demonstrînd alterările în organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv, apărute ca urmare a îmbătrînirii organismului. Aceste alterări se reflectă și în procesul mai lent de cicatrizare și, mai ales, de contracție spontană a plăgilor [281], ca și în absența modificărilor de stabilitate structurală a colagenului din zonele învecinate plăgii [498]. În schimb, neoformarea țesutului conjunctiv din granulomul inflamator sau de altă natură, pare a fi asemănătoare la toate vîrstele, anumiți autori susținînd chiar că la bătrîni apare un turnover extrem de activ al macromoleculelor, asemănător celui din țesutul conjunctiv embrionar.

Toată această complexitate de procese și de reacții, suprapusă peste complexitatea organizării macromoleculare a țesutului conjunctiv, ne fac să primim cu multă rezervă încercările de simplificare bazate pe rezultatele unor modele experimentale. De altfel, variabilitatea metodelor de investigație nu permite pînă acum să se delimiteze momentul de trecere de la tînăr la bătrîn, și nici de la bătrîn la patologic. De aceea, modul de interpretare a rezultatelor continuă să fie destul de subiectiv, depin-

Scanned with OKEN Scanner

zînd atît de tehnicile utilizate cît şi de experienţa personală a cercetătorilor. În încheierea acestor discuţii, extinse cu scopul de a nu lăsa cititorului impresia că este rezolvată cunoaşterea mecanismului prin care îmbătrînesc organismele, în general, şi macromoleculele, în special, am dori să subliniem şi faptul că nu s-a putut demonstra pînă acum că în fiecare organ şi ţesut se produce, o dată cu înaintarea în vîrstă, o creştere a numărului de legături dintre macromoleculele de colagen. În numeroase investigaţii s-a constatat că acest număr nu se mai modifică după ce perioada de creştere s-a încheiat, iar în anumite teritorii, înmulţirea legăturilor a alternat cu zone în care erau net diminuate[301]. Cercetări recente ne-au permis să demonstrăm că, la adult, zonele din peretele aortic cele mai susceptibile la dezvoltarea aterosclerozei, conţin un ţesut conjunctiv cu un număr extrem de redus de legături intermoleculare [1109].

Desigur că un spaţiu larg ar trebui acordat şi variabilităţii constelaţiei hormonale în cursul înaintării în vîrstă, rezultînd modificări importante în remodelarea ţesutului conjunctiv. În ultimul capitol al lucrării vom descrie pe larg cum acţionează fiecare hormon în parte, putîndu-se deduce alterările ce ar rezulta din absenţa sau diminuarea anumitor produşi, în special cei elaboraţi de glandele sexuale. Menţionăm, pentru a sublinia interesul deosebit al acestei probleme, că, la şobolani, femelele cu sarcini repetate au un ţesut conjunctiv mult mai „bătrîn", decît masculii de aceiaşi vîrstă [32]. De asemenea, s-a constatat că alterările de vîrstă în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv apar mult mai puţin nete, dacă animalul a fost, în prealabil, castrat [506].

*

Ipoteza îmbătrînirii organismului ca urmare a înmulţirii legăturilor intermoleculare, extinsă şi la nivelul acizilor dezoxiribonucleici şi al altor proteine şi heteroproteine, a sugerat şi încercări de terapeutică. Astfel, s-a recomandat o reducere a aportului de calorii şi de ingerare a anumitor alimente al căror metabolism ar da naştere la produşi capabili să interconecteze macromoleculele de colagen. O altă linie de tratament sugerează administrarea de substanţe care ar reacţiona rapid cu radicalii liberi, fără a face şi legături intermoleculare. S-au utilizat în acest sens cisteina, 2-mercaptoetilamina, hidroxilamina etc., obţinîndu-se, la şoarece, o prelungire cu aproximativ 25% a duratei medii de viaţă [458]. O altă linie terapeutică se adresează utilizării unor agenţi latirogeni, în doze considerate ca netoxice pentru adult [607]. Numeroase date experimentale au demonstrat că agenţii latirogeni, şi în special beta-amino-propionitrilul, împiedică monomerii din macromolecula de colagen să se unească în dimeri, şi dimerii în trimeri etc.[706]. Plecîndu-se de la aceste date s-a recomandat o profilaxie a bătrîneţii prin administrarea continuă şi în cantităţi netoxice de agenţi latirogeni, susţinîndu-se că este mai uşor să previi formarea unor legături intermoleculare, decît să le rupi după ce s-au constituit [607]. De aceea, descoperirea de noi agenţi cu efect *anti cross-linked* constituie o permanentă preocupare în multe colective de cercetare.

Scanned with OKEN Scanner

Înainte de a prezenta amănunțit cum se reflectă procesul de îmbătrînire în organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv din vase, cord, plămîni, cartilaj, os și piele, organe cu cea mai bogată și mai constantă patologie a vîrstei înaintate, vom menționa anumite date cuprinzînd studii efectuate simultan pe mai multe țesuturi și organe.

Astfel, la șobolanul tînăr, se poate extrage aproximativ 30% din cantitatea totală de colagen existentă în rinichi, plămîni și ficat, iar la cel bătrîn doar aproximativ 4%, sugerînd o creștere a gradului de insolubilizare, paralel cu înaintarea în vîrstă. Această creștere nu este însă de intensitate egală în cele trei organe investigate, insolubilizarea colagenului, la aceleași grupe de vîrstă, apărînd mai rapid în ficat, în comparație cu rinichiul. În același timp s-a constatat că ea este mai rapidă în toate parenchimurile, în comparație cu tendonul. În afara gradului de insolubilitate s-au notat și creșteri cantitative ale colagenului total, care, în ficat, rinichi și plămîn depășește, de aproximativ trei ori la animalele bătrîne valorile constatate la animalele tinere [947].

Utilizarea de acizi aminați marcați a permis să se evidențieze că, în toate organele și țesuturile, încorporarea lor în fibrele de colagen și de elastină este mai abundentă la animalele tinere, în comparație cu cele bătrîne. La șobolan, de exemplu, după vîrsta de 2 ani, nu se mai pot detecta, cu ajutorul radioizotopilor, procese de sinteză ale colagenului și elastinei în tendon și în piele. În schimb, în uter persistă același ritm de sinteză în tot cursul vieții [547].

Studii asupra aortei toracice, miocardului și pielii de om, între 4 și 26 de ani, menționează scăderea cantității totale de mucopolizaharide acide, dar cu creșterea particulară a dermatan- sulfatului (condroitin sulfatul B). Ca urmare a diminuării mucopolizaharidelor, raportul acizi uronici/hidroxiprolină și hexozamină/hidroxiprolină descrește progresiv, de la făt, la bătrîn [218, 219]. Reducerea cantității de mucopolizaharide, paralel cu înaintarea în vîrstă este confirmată și de studii cu sulf radioactiv, efectuate pe grupe de șobolani de 4 săptămîni, de 4 luni și de 3 ani. În aortă, miocard, splină, plămîni, ficat, rinichi și cartilaj, încorporarea radioizotopului apare cu atît mai redusă, cu cît animalul este mai bătrîn [406]. Această diminuare a capacității de sinteză a mucopolizaharidelor acide sulfatate a fost interpretată ca reflectînd un turnover mai lent, care duce la o sărăcire a cantității de substanțe mucoide din țesutul conjunctiv.

Cu limitele impuse de condițiile proprii fiecărui experiment, din studiile efectuate simultan pe variate organe și țesuturi, se conturează complexitatea modificărilor de vîrstă în organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv. Ea va apare și mai evident din cercetarea amănunțită a acestui proces la nivelul fiecărui țesut și organ în parte.

Scanned with OKEN Scanner

VASE

Studiul senescenţei vaselor implică depăşirea a două mari dificultăţi : prima, se referă la intricarea ce există între procesele de creştere, adaptare şi îmbătrînire a arterelor ; a doua, se referă la intricarea ce există între alterările produse de senescenţă şi cele datorită aterosclerozei. Deşi aceste două mari dificultăţi sînt încă departe de a fi învinse, se acceptă în general că modificările de vîrstă ale vaselor reprezintă cauza principală a îmbătrînirii, atît prin patologia arterială asociată senescenţei, cît şi prin tulburările de troficitate ce apar în toate organele şi ţesuturile, ca urmare a alterărilor morfo-funcţionale ale peretelui vascular.

Pe primul plan al investigaţiilor în acest domeniu s-au impus coronarele, aorta şi arterele cerebrale, principalele focare de ateroscleroză şi de complicaţii tromboembolice. Cercetări efectuate la variate epoci ale evoluţiei ontogenetice au demonstrat că, înainte de naştere, sau imediat după naştere, apare un proces de proliferare a intimei arterelor, care se accentuează progresiv cu înaintarea în vîrstă.

În cercetări efectuate pe artere periferice s-a evidenţiat, de asemenea, existenţa unui raport direct între înaintarea în vîrstă şi creşterea grosimei intimei. Exemplul cel mai demonstrativ a apărut la nivelul tibialei anterioare, la care grupul de vîrstă de peste 55 de ani a prezentat o dublare a grosimei intimei, în raport cu grupul sub 55 de ani [270]. În sfîrşit, menţionăm că în carotida internă, intima începe să se îngroaşe din a 10-a săptămînă a vieţii, în artera vertebrală din al 2-lea deceniu, artera brahială din al 3-lea, iar în arterele digitale din deceniile 3—4 [1200].

Toate aceste observaţii fac ca afirmaţia clasică, conform căreia intima arterelor este alcătuită dintr-un strat de celule endoteliale dispuse pe o limitantă elastică internă, să aibă valoare doar pentru animalele mici de laborator.

La om, intima „normală" a coronarelor şi a aortei de adult apare ca un strat complex, în grosimea căruia au putut fi individualizate patru zone : *a*) endoteliul ; alcătuit dintr-un singur rînd de celule *b*) regiunea subendotalială, bogată în substanţă fundamentală intens metacromatică şi lipsită, în general, de fibre fucsinofile ; *c*) regiunea intermediară, bogată în ţesut elastic şi reţele reticulinice ; *d*) regiunea de trecere spre media arterei, conţinînd fibre colagene, elastice şi reticulinice, precum şi numeroase celule musculare netede [537.739.756.768]. În anumite artere, cum ar fi coronarele, grosimea acestei intime depăşeşte pe cea a mediei [382.537.790].

În general, modul de organizare macromoleculară a intimei este atît de complex şi de variabil încît pare greu de descris un patern histochimic [244].

S-au făcut numeroase investigaţii cu scopul de a elucida semnificaţia acestui proces de îngroşare a intimei, atît de caracteristic evoluţiei ontogenetice a omului, sugerîndu-se că el ar reprezenta :

— Un răspuns fiziologic la modificările hemodinamice care apar în circulaţia arterială înainte de naştere, determinat de creşterea şi remodelarea peretelui vascular [537.790].

Scanned with OKEN Scanner

— Un proces de reparație a insultelor produse de microtraumatismele presiunii intralumenale asupra unui perete arterial încă nematur și care determină, la făt și la nou-născut, ruperea limitantei elastice interne și a plăcilor elastice ale mediei. În acest sens, proliferările celulare, acumulările de mucopolizaharide și neoformările fibrilare ar reprezenta răspunsul organismului la microtraumatismele hemodinamice [755,973].

— Un proces de proliferare a elementelor endoteliale, asociat cu o creștere a capacității lor secretorii, ducînd la elaborarea de mucopolizaharide acide sulfatate în zona subendotelială [244,1101].

— Consecința pătrunderii în intimă a celulelor musculare netede din medie, cu elaborarea ulterioară de substanță fundamentală și componente fibrilare [258, 472]. Același proces poate fi consecința scăderii presiunii intralumenale, ducînd la o „sucțiune" a peretelui vascular, determinînd hernierea în intimă a celulelor musculare ale mediei [177], proces care apare și în vasele ținute între două ligaturi [168].

— Rezultatul unor inflamații determinate de acumulări de macromolecule de tipul fibrinei, care acționează ca stimuli fibrogenetici [244].

— Efectul unor modificări hemodinamice care, prin creșterea vitezei curentului axial, produc presiuni negative la suprafața endoteliului, favorizînd procesul de „sucțiune" a mediei [1066].

— Răspunsul țesutului conjunctiv vascular la tensiuni coborîte ale oxigenului, intensitatea proliferării intimei părînd a fi determinată de condițiile ischemice locale [19,118,374].

— Un tip particular de reacție la anumite modificări ale mediei, grosimea intimei crescînd paralel cu gravitatea alterărilor stratului subiacent [667].

— Un tip particular de reacție la anumite condiții metabolice, de exemplu lipsa vitaminei E, care determină la șobolani o îngroșare importantă a intimei și care dispare după normalizarea regimului alimentar [1047].

Investigațiile noastre în acest domeniu, pe baza unui studiu comparativ între coronara stîngă și dreaptă de la același caz, secționate perpendicular pe axul longitudinal al vasului, au adus unele date noi în acest vast cîmp de studiu. Prelucrarea statistică prin testul de semnificație a diferențelor între medii, a evidențiat grosimi variate ale intimei celor două vase, în prima decadă a vieții. Aceste diferențe, intens semnificative, ar rezulta în special din absența îngroșării intimei coronarei drepte imediat după naștere, în timp ce, în coronara stîngă există un țesut conjunctiv foarte dezvoltat între endoteliu și limitanta elastică internă [889]. Alte investigații în acest domeniu ne-au permis să constatăm că nu se pot face corelații între grosimea intimei și vîrstă decît pe grupe mari de subiecți, analiza fiecărui caz în parte fiind de multe ori nesemnificativă [1116]. Un alt exemplu asupra variabilității factorilor care pot influența corelația dintre intensitatea îngroșării intimei și vîrsta cazului respectiv, îl constituie lucrările noastre asupra plămînilor de tabagici cu endarterite hiperplazice [680]. Printre acești factori de variabilitate am evidențiat vechimea tabagismului și dispoziția topografică a segmentului pulmonar ale cărui vase au fost analizate. În

Scanned with OKEN Scanner

special particularitatea topografică a fiecărui segment pulmonar ar constitui o cauză fundamentală a îngroşării intimei, atît la tabagici, cît şi la nefumători, această îngroşare fiind mult mai des întîlnită în teritoriile vasculare ale lobilor inferiori, în comparaţie cu cei superiori şi mijlocii. Recent, au fost descrise hiperplazii ale intimei, corelate cu tabagismul, în arterele căilor aeriene, esofagului, peretelui gastric, pancreasului şi suprarenalei [41], limitînd şi mai mult posibilităţile de a deosebi ceea ce este determinat de înaintarea în vîrstă, de ceea ce este determinat de efectul toxic al substanţelor conţinute în fumul de tutun.

Investigaţii analitice asupra diferitelor macromolecule din ţesutul conjunctiv al peretelui arterial au evidenţiat următoarele date:

Elastina

De aproape un secol s-a menţionat că peretele arterial este alterat în cursul îmbătrînirii organismului, în primul rînd prin componentele elastice. Aceste observaţii au căpătat un interes deosebit atunci cînd s-a demonstrat că, după injectarea de adrenalină, apar modificări ale ţesutului elastic al arterelor, modificări similare cu cele întîlnite în cursul senescenţei [539]. Ulterior a fost demonstrată, histologic, diminuarea numărului de fibre elastice o dată cu înaintarea în vîrstă [55]. Primele investigaţii biochimice în acest domeniu menţionează o reducere, de la 48 % la 41 %, a elastinei din peretele arterial, între primul şi al 9-lea deceniu al vieţii [675]. Analize mai amănunţite au demonstrat că elastina constituie 30—51 % din peretele arterial între 23 şi 29 de ani şi 26—30 %, între 63 şi 88 de ani [942].

Numeroase artere din organism îşi măresc, în cursul evoluţiei ontogenetice, diametrul transversal, necesitînd procese de remodelare. În vasele mari remodelările încep încă din cursul vieţii intrauterine, continuînd, după naştere, în primii ani ai copilăriei şi reapărînd ori de cîte ori solicitări anormale impun o schimbare a paternului metabolic. Aceste remodelări pot fi transformate în procese patologice, prin suprapunerea unor factori nefiziologici de natură hemodinamică, a unor carenţe alimentare, insuficienţe endocrine sau tulburări de reglare neuroendocrină, precum şi prin efectul direct al unor agenţi infecţioşi sau alergizanţi. În aceste condiţii de remodelare inadecvată se creează zone de alterare a filtrării transintimale a lipidelor şi fibrinogenului, favorizîndu-se dezvoltarea aterosclerozei. Apariţia precoce a unor focare aterosclerotice la tineri de 10—15 ani a fost corelată cu formarea zonelor de remodelare inadecvată a ţesutului elastic [489].

Analizele noastre histochimice au demonstrat că procesul de remodelare a fibrelor elastice se însoţeşte, imediat după naştere, şi de o schimbare importantă a paternului vascular al mucopolizaharidelor acide. În afara acumulărilor obişnuite subendoteliale de material predominant heparinic, iar în zona profundă a intimei de condroitin-sulfaţi şi acid sialic, am mai constatat: *a*) prezenţa unor bule metacromatice în intima îngroşată, în zonele cu limitanta elastică fragmentată, alcătuite din condroitin-sulfaţii

Scanned with OKEN Scanner

A și C și evidențiabile doar în primii trei ani ai vieții extrauterine ; *b*) existența unui manșon gros mucopolizaharidic în jurul fibrelor elastice degenerate, format din complexe mucoprotidice rezistente la incubația cu hialuronidază testiculară ; *c*) apariția de acumulări dense de mucopolizaharide acide de tipul condroitin-sulfaților și heparitin-sulfatului, în spațiile dintre fibrele elastice fragmentate. În marea majoritate a cazurilor, acest proces atît de complex, ce afectează organizarea tuturor tipurilor de macromolecule ale țesutului conjunctiv, dispare către vîrsta de 7 ani.

Cercetările de biochimie efectuate pînă acum nu au evidențiat substratul alterărilor calitative ale elastinei din plăcile elastice supuse procesului de remodelare. La făt s-a notat o scădere progresivă a conținutului elastinei în lizină și o creștere a desmozinei și a tirozinei, care continuă pînă spre vîrsta de 1 an. În aceeași perioadă apar și primele legături încrucișate între macromoleculele de elastină, creînd condițiile adecvate de stabilitate structurală [611]. Ulterior, cu înaintarea în vîrstă, se măresc și valorile hidroxiprolinei, acizilor aspartic și glutamic, precum și ale lizinei, scăzînd, în schimb, cantitățile de tirozină și fenilalanină. Aceste modificări s-ar însoți și de o creștere a gradului de stabilitate structurală, reflectat de rezistența, din ce în ce mai mare, opusă de lamele elastice din aortă la metodele convenționale de degradare [610].

Un alt aspect particular al „îmbătrînirii" elastinei din arterele mari ar fi incapacitatea de a îngloba radioizotopi, sugerînd o totală inerție metabolică. Acest proces poate fi constatat și experimental, după administrarea de glicină marcată, obținîndu-se pe minut 2 000 de impulsuri din aorta de șobolan în vîrstă de 4 săptămîni, 1 500 de impulsuri la animalul de 3 luni și numai 700 de impulsuri la cel de 3 ani [1151].

Alte studii, utilizînd tot C_{14} glicină, constată că încorporarea maximă are loc către a 28-a zi a vieții șobolanului, după care, timp de 3 ani, izotopul rămîne blocat în lamele elastice ale aortei, ceea ce ar sugera că atît la animalul adult, cît și la cel bătrîn, se reduce turnoverul în aceste structuri conjunctive [1159]. La om s-a notat aceiași scădere cu vîrsta a turnoverului, încorporarea cea mai redusă fiind între 70 — 80 de ani. Aceste date ar sugera că, totuși, se mai sintetizează o anumită cantitate de elastină chiar în cursul senescenței, și că ea s-ar depune la periferia structurilor preexistente, contribuind la creșterea numărului de legături intermoleculare și la modificări cantitative ale aminoacizilor [1210]. La microscopul electronic procesul de îmbătrînire a țesutului elastic se traduce prin aspecte de rarefiere, reduplicare și fragmentare. Ele se asociază cu imagini sugerînd pătrunderea, în masa lamelor elastice, de prelungiri ale protoplasmelor celulelor și ale unor grupe de fibrile de colagen [555].

În privința modului cum se modifică stabilitatea structurală a fibrelor elastice o dată cu înaintarea în vîrstă, rezultatele sînt contradictorii. Anumiți autori susțin că datorită creșterii cantității de aminoacizi cu grupări polare, elastina își mărește progresiv susceptibilitatea la elastază, fiind, de asemenea, mai rapid extrasă prin metode chimice. Astfel s-ar explica de ce fibrele elastice din aorta de bătrîn sînt mai ușor degra-

Scanned with OKEN Scanner

date, decît cele din aorta de tînăr [59,772]. Alţi autori susţin însă că, dimpotrivă, o dată cu înaintarea în vîrstă creşte numărul de legături încrucişate dintre macromoleculele de elastină şi apare o hiperstabilitate structurală, caracterizată prin rezistenţa la digestia cu elastază şi la variate extracţii chimice. Se precizează chiar că elastaza poate degrada 100% din elastina aortei de tînăr, şi numai aproximativ 45%, din elastina aortei de bătrîn [608]. Proteina ce rezultă din degradare a putut fi solubilizată în proporţie de 40% la tineri, şi de numai 15% la bătrîni, ceea ce ar constitui un alt argument în favoarea ipotezei că numărul de legături intermoleculare creşte progresiv cu vîrsta. Acest proces de interconectare a macromoleculelor de elastină, legat de îmbătrînirea organismului, a fost comparat cu transformarea pe care o suferă cauciucul în cursul vulcanizării [237]. Ambele devin mai puţin maleabile, mai rigide, dar şi mai friabile.

Creşterea numărului de grupe reactive menţionate anterior, modificarea compoziţiei macromoleculare a tecii perifibrilare, precum şi alţi factori încă necunoscuţi ar contribui la reţinerea din circulaţie a unor metaboliţi intermediari care, ca şi la colagen, interconectează suplimentar macromoleculele [608]. Este probabil că limitele metodelor de separare a colagenului de elastină, precum şi a substanţei fundamentale perifibrilare de fibrele ce sînt incluse în ea, constituie cauza principală a acestor rezultate, atît de discordante. În afara factorului purificare, mai intervine, hotărîtor, ca element de apreciere subiectivă, noţiunea de fibră sau lamă elastică. Dacă la coloraţiile histologice şi la examenele electronomicroscopice identificarea acestor structuri nu prezintă, în general, dificultăţi, din punct de vedere biochimic nu se poate preciza niciodată, ce s-a extras şi ce nu s-a extras dintr-o fibră elastică. Pentru a familiariza cititorul cu complexitatea acestei structuri, menţionăm că, la lumina polarizată au putut fi evidenţiate mai multe componente submicroscopice şi anume: *a*) o matrice care se colorează cu orceină şi permite vizualizarea histologică a fibrei; *b*) un complex mucoid-elastină, care devine intens anizotrop la albastru de toluidină; *c*) un complex denumit fenolelastoid, deoarece apare pozitiv la reacţia cu fenol şi care ar putea fi similar colagenului [65]. Analiza complexului enzimatic cunoscut sub denumirea de elastază a permis să se constate că fracţiile denumite E_1 şi E_2 au efecte diferite pe structurile care intră în constituţia fibrei. Astfel, factorul enzimatic E_2 lasă intactă matricea fibrei şi degradează rapid componentele filamentoase din nucleul central; în schimb, E_1 degradează mai întîi teaca fibrei şi substanţa fundamentală din jurul ei, alterînd ulterior masa centrală a lamei elastice. Aceste date evidenţiază organizarea macromoleculară diferită a celor două substrate, precum şi stabilitatea lor structurală deosebită [74].

De aceea, problema dacă elastina „îmbătrîneşte", sau nu, prin mecanisme similare colagenului, rămîne să fie rezolvată printr-o perfecţionare viitoare a metodologiei.

Asupra elastinei din artere acţionează, în tot cursul vieţii, un mecanism de reglare alcătuit din complexul enzimatic al elastazei şi inhibitorii

Scanned with OKEN Scanner

respectivi. Dereglarea raportului elastază/inhibitori, o dată cu înaintarea în vîrstă, poate constitui o cauză suplimentară de modificare a stabilității structurale a fibrelor elastice, absența enzimei mărind stabilitatea, excesul de enzimă, micșorînd-o. Plecîndu-se de la acest raport, care asigură capacitatea funcțională maximă țesutului elastic, se poate deschide un cîmp nou de investigație asupra mecanismelor de „îmbătrînire" a macromoleculelor de elastină.

O altă modificare de vîrstă a elastinei din artere este afinitatea patologică de a fixa săruri de calciu, proces reflectat de mineralizarea peretelui vascular. Acest proces se caracterizează prin depunerea de săruri de calciu sub formă de apatită pe fibrele elastice ale unor artere care nu prezintă aspecte patologice, ci doar aparțin unor subiecți care au depășit perioada tinereții. Arterele pulmonare suferă mineralizarea mult mai tardiv decît aorta, deși conțin o mare cantitate de țesut elastic, ceea ce ar sugera că factorul bătrînețe mai este asociat și cu acțiunea altor agenți, legați în special de procese hemodinamice. Aceasta ar explica și de ce, spre deosebire de calcificările din ateroscleroză care au un caracter focal bine delimitat, mineralizările datorită înaintării în vîrstă sînt difuze.

Concepțiile actuale se grupează în jurul a două mecanisme prin care s-ar iniția calcificarea arterelor în cursul îmbătrînirii. Primul sugerează o alterare metabolică generală, calciul și fosforul fiind translocate din ser în matricea vaselor, unde ating concentrații ce depășesc limitele de solubilitate locală. Al doilea mecanism sugerează existența, în peretele arterial însăși, a unor modificări de organizare macromoleculară, care inițiază calcificarea, inducînd precipitarea sărurilor din soluții stabile, proces cunoscut sub denumirea de „nucleare". În această ultimă eventualitate, activitatea celulară ar juca un rol neînsemnat, pe primul plan apărînd grupele reactive ale elastinei, de tipul epsilon-amino ale lizinei și hidroxilizinei, ca și prezența fosfatului, legat covalent de macromolecula de elastină. În sfîrșit, mai menționăm ca o ipoteză mai nouă privind calcificarea arterelor, procesul de „fugă" a calciului din oase o dată cu înaintarea în vîrstă, exteriorizat prin osteoporoza senilă. În favoarea acestei ipoteze ar pleda și observația că femeile prezintă o mineralizare maximă a aortei, în perioada cînd apare osteoporoza de menopauză [134].

Anumite date susțin că evidențierea calciului în țesutul elastic al aortei de om devine mai netă începînd de la 20 de ani. La această vîrstă, concentrația calciului în peretele arterial este de 0,2%, pentru a ajunge, către 50 de ani, la 5 — 8% [627]. Această considerabilă acumulare permite detectarea mineralizării și cu metode histochimice, cum ar fi colorația cu substanțe alizarinice, microincinerarea sau microscopia cu interferență. De asemenea, calcificarea incipientă este evidențiată și la microscopul electronic sau la difracția cu raze X.

Dintre modificările de vîrstă constant întîlnite, care ar putea explica afinitatea mărită a fibrelor elastice pentru săruri de calciu, pe primul plan se situează creșterea aminoacizilor polari în elastină. Grupele acestor aminoacizi ar constitui centre suplimentare de nucleare a mineralizării, proces demonstrat și experimental după administrare de Ca^{45} [1209]. Aceasta

Scanned with OKEN Scanner

ar explica, de ce, *in vitro*, fragmente de aortă de la animalele bătrîne induc calcificarea prin legarea calciului şi fosforului din mediul de incubaţie, sub formă de hidroxiapatită, depusă pe lamele elastice. Procesul nu este blocat de inhibitori ai metabolismului celular, sugerînd că ar avea loc fără participarea celulelor musculare ale mediei. În acelaşi sens, pledează observaţia că mineralizarea nu este mai intensă în zonele bogat celulare şi că reţinerea calciului şi fosforului ar fi un proces extrem de lent, apărînd mai evident pe fibrele elastice izolate, decît pe peretele vascular în totalitate [953]. Blocarea , *in vitro*, a grupelor SH inhibă stadiul iniţial de mineralizare a aortei, ceea ce ar pleda pentru necesitatea unei etape de oxidare a grupărilor sulfhidrilice în disulfidice. În acelaşi sens poate fi interpretat şi efectul accelerator al cisteinei şi mercaptoetanolului. Faptul că nu s-au găsit compuşi sulfhidrilici în precipitat ar sugera că nu este vorba de o simplă acţiune de chelare a calciului. Într-un stadiu mai tardiv al nucleerii, participă activ şi grupele NH_2, probabil atît în legarea, cît şi în alinierea cristalelor [953]. Şi în analiza acestui proces rezultatele sînt limitate de metodologia utilizată, încercarea uzuală de purificare a elastinei cu NaOH 0,1 *N* la 90°C, eliminînd din complexul macromolecular numeroşi constituienţi ce ar putea iniţia sau participa la procesul de mineralizare. În ceea ce priveşte influenţa a variate enzime şi substanţe chimice asupra capacităţii de calcificare a aortei, menţionăm, în primul rînd, observaţia că, digestia cu elastază, cu hialuronidază testiculară, ca şi extracţia cu glucoză 0,25 *M*, nu au alterat această capacitate, cel puţin în condiţiile de lucru menţionate. Dimpotrivă, apar inhibiţii nete după tratare cu fosfatază alcalină şi după digestia cu tripsină. Dacă se elimină condroitin-sulfaţii din peretele aortei, mineralizarea pare amplificată [318]. Aceste rezultate ar sugera că, factorii care favorizează mineralizarea aortei, paralel cu înaintarea în vîrstă sînt de natură proteică, fiind susceptibili la acţiunea tripsinei, probabil un complex proteină-fosfolipide.

Date de microscopie cu interferenţă indică şi teaca fibrelor elastice ca sediu posibil al calcificării, deşi limitele dintre teacă şi nucleul central sînt uneori greu de precizat.

O altă linie de cercetare în acest domeniu pune accentul principal pe variaţiile cantitative ale cationilor şi anionilor. La tineri, aorta conţine numeroşi cationi de Na^+, K^+ Ca^{++}, Mg^{++}, Fe^{++}, Fe^{+++} cantităţi mai reduse de alţi cationi, precum şi anioni de Cl^-, HCO_3^-, $H_3PO_4^-$, HPO_4^{--}, PO_4^{---} şi SO_4^{--}. La bătrîni, o dată cu reducerea conţinutului în apă, scad atît cationii, cît şi anionii, cu excepţia Ca^{++} şi a PO_4^{---}, care ating, în unele zone ale peretelui vascular, concentraţii apropiate de cele din os. Izolarea elementelor structurale constitutive ale intimei şi mediei a permis să se demonstreze că, atît calciul, cît şi fosforul se aglomerează pe plăcile elastice sub formă de $[Ca_{10}(PO_4)_6CO_3]$ şi sub forma unui alt tip de amestec de carbonat de calciu şi hidroxiapatită [1212]. Experimental, această captare masivă de calciu apare în aortă mai ales după administrarea de adrenalină, aşa cum rezultă din studii utilizînd Ca^{45}. La microscopul electronic se văd depuneri de cristale de hidroxiapatită, ca în calcificările „fiziologice". Ele au un diametru de 250/50 Å, o orientare întîmplătoare şi se găsesc în special la peri-

Scanned with OKEN Scanner

feria fibrelor elastice. Aceasta ar sugera că aminoacizii bogați în grupări polare s-ar acumula în teaca fibrelor, creînd la acest nivel condițiile apariției nucleerii cristalelor [1212].

Ar rezulta, din datele menționate, că elastina din artere are o proprietate intrinsecă de a se mineraliza și că această proprietate se accentuează o dată cu înaintarea în vîrstă, datorită modificărilor în organizarea macromoleculară a fibrelor elastice. Ea nu apare însă cu aceeași intensitate în toate segmentele aceluiași vas și nici în straturi învecinate, aparținînd aceluiași segment. Astfel, în intima aortei toracice nu s-a putut evidenția o creștere a cantității de calciu paralel cu înaintarea în vîrstă, pe cînd în media aceluiași segment vascular această creștere a apărut puternic semnificativă, de la 200 la 3 500 mg/100 g de țesut uscat [119]. Procesul de mineralizare implică și intervenția unor mecanisme suplimentare, cum ar fi eliberarea de acizi grași din fibrele elastice degenerate, acționînd fie prin formarea de săpunuri de calciu, fie prin intermediul calcifilaxiei [986]. Apariția de modificări cantitative în substanța fundamentală ar favoriza, de asemenea, reținerea și precipitarea sărurilor de calciu [651], ca și formarea de nuclee de mineralizare la suprafața fibrelor de colagen [718]. Aceste calcificări cu caracter difuz și neselectiv se întîlnesc în special în teritorii cu hipoxie accentuată a peretelui vascular, determinată de îngroșarea exagerată a intimei, creșterea anormală a fibrelor colagene, insuficiența irigației prin vasa vasorum etc. Faptul că s-au putut obține mineralizări masive ale aortei de șobolan, prin simpla „tratare" a animalelor cu aerul rarefiat de la altitudinea de 5 000 m, sugerează importanța factorul hipoxic, ca agent agravant al calcificării arterelor [179]. Dar, în afara acestor cauze accesorii, tendința de difuzare a depunerilor de cristale de hidroxiapatită la toate structurile peretelui arterial, are ca mecanism intrinsec însăși modul de dezvoltare a centrelor de nucleare. În acest sens, fiecare cristal de hidroxiapatită legînd apă și electroliți, creiază în vecinătatea sa condițiile precipitării unui nou cristal, procesul extinzîndu-se în suprafață, fără a mai fi dependent de substratul histologic.

Modul nostru de prezentare a căutat să simplifice cît mai mult complexitatea datelor privind condițiile care pot favoriza sau determina mineralizarea arterelor, limitînd această problemă în special la fibrele elastice. Cu toată bogăția de rezultate de care dispunem în acest domeniu, numeroase întrebări rămîn fără răspuns. Astfel nu știm de ce, la un individ de 80 de ani, se mineralizează masiv fibrele elastice din aortă, iar elementele similare din artera femorală rămîn total necalcificate [370]. Întrebarea se va repeta și cînd va fi discutat procesul de calcificare a cartilagiilor hialine, care prezintă, de asemenea, o mare varietate a susceptibilității la mineralizare în cursul îmbătrînirii. Precizarea factorilor adiționali care favorizează mineralizarea va însemna un important pas înainte în domeniul medicinei preventive.

Acești factori trebuiesc analizați nu nnmai în peretele vascular, ci și în ser. În acest sens pledează observațiile că procesul de calcificare a aortei se accentuează dacă se adaugă serului fosfatază alcalină, sugerînd că această enzimă blochează sau distruge un inhibitor al mineralizării, prezent în ser.

Un anumit rol îl joacă, de asemenea, cantitatea de calciu ionizat, care, la bătrîni, creşte, probabil ca urmare a degradării componentei proteice de care este legată forma neionizată a calciului. Aceste date, încă limitate, aduc un început de precizare asupra mecanismelor de inhibare fiziologică a calcificării arterelor, mecanisme care par să se deregleze, începînd din al 2-lea deceniu al vieţii. În lumina acestor date, reducerea procesului de mineralizare a aortei la o simplă interacţiune epitactică între calciu şi fosfat, pe de o parte, şi creşterea numărului de grupe reactive în elastină, pe de altă parte, limitează complexitatea acestui proces, în care, alterările locale reflectă modificări metabolice cu caracter general.

Calcificarea arterelor la bătrîni are numeroase implicaţii funcţionale. S-a demonstrat că, paralel cu creşterea depunerilor de cristale de hidroxiapatită pe fibrele elastice, acestea îşi măresc, la rîndul lor, gradul de cristalinitate. Depozitele amorfe de calciu nu produc acest efect, ceea ce ar demonstra că hidroxiapatita induce, prin intermediul punţilor de hidrogen şi al altor forţe de interconectare, o rearanjare macromoleculară în structurile elastice. Acest proces este foarte clar demonstrat prin studii de difractometrie la raze X, care evidenţiază, la subiecţi între 41 şi 86 de ani, o creştere progresivă a cristalinităţii [1173]. Ea se însoţeşte de o alterare a extensibilităţii fibrelor, care îşi măresc rigiditatea, dar devin mult mai fragile şi se rup la solicitări mecanice de intensităţi medii. Aceste alterări intră în cadrul larg al leziunilor microscopice încadrate în aşa-zisa patologie a vîrstei înaintate, a căror histogeneză începe, treptat, să fie clarificată.

Colagenul

Se consideră colagenul din fibre ca principalul component macromolecular care asigură rezistenţa la tracţiune în peretele arterial. Acest lucru este demonstrat de paralelismul net între creşterea cantitativă a colagenului în aorta de embrion şi mărirea progresivă a rezistenţei mecanice a vasului [642].

Un exemplu al dinamicii variaţiilor cantitative ale colagenului în funcţie de înaintarea în vîrstă, apare din datele obţinute prin studiul aortei de şobolan. Astfel, s-a constatat că, la 100 g de ţesut uscat există 7,4 g colagen la animalul de 4 săptămîni, 9,5 g la cel de 8 săptămîni, 10,4 g la cel de 4—5 luni [547].

La om, cantitatea maximă de colagen, ar fi atinsă în deceniul al 2-lea, apoi rămîn valori relativ constante pînă în deceniul al 7-lea, cînd apare o nouă creştere, sugerînd o modificare adaptativă tîrzie [643]. Există însă variaţii destul de importante de la un segment vascular la altul, de care trebuie să se ţină seamă în aprecierea modificărilor de vîrstă. Astfel, după ce perioada de creştere s-a terminat, colagenul ajunge să reprezinte 24,02% din peretele aortei abdominale, şi numai 14,32% în arcul aortei [276]. Considerînd colagen materialul birefringent, cu reacţia fenol pozitivă,

Scanned with OKEN Scanner

colorabil cu picrofucsină van Gieson și susceptibil la digestia cu colagenază, am demonstrat histochimic apariția unei creșteri progresive a colagenului, în aorta de om, în primele trei decenii ale vieții [1120]. În afara creșterilor cantitative, s-a mai notat, o dată cu înaintarea în vîrstă, și o modificare a paternului aminoacizilor din macromolecula colagenului din fibrele aortei. Ea se caracterizează prin mărirea valorilor treoninei, hidroxiprolinei și alaninei și prin diminuarea glicinei, izoleucinei și tirozinei [697]. Un alt tip de modificări ce însoțesc îmbătrînirea organismului se referă la stabilitatea structurală a macromoleculelor. Observația că, o dată cu înaintarea în vîrstă, se reduce cantitatea de colagen degradat de colagenază [332,787] și diminuă susceptibilitatea la colagenmucoproteinază cu aproximativ 50% [65], ar sugera o creștere a numărului de legături intermoleculare, respectiv convertirea normostabilității, în hiperstabilitate structurală. Importanța stabilității structurale a fibrelor de colagen, în determinarea rezistenței mecanice a peretelui vascular a fost demonstrată și prin studiul așa-zisului „indice de fragilitate". Acest indice a fost desemnat, în mod arbitrar, ca rezultînd din raportul: timpul (în secunde) necesar pentru a rupe peretele arterial/greutatea în g a animalului, aplicînd asupra peretelui o tracțiune constantă de 10 g [640,641]. Rezultatele cele mai spectaculare au apărut la embrion, unde s-a constatat un indice de fragilitate de 1,4, în a 14-a zi a vieții intrauterine, la un animal cîntărind 11,94 g și conținînd în aortă 1,05 $\pm$ 0,02% hidroxiprolină și de 7,0, la embrionul de 16 zile, cîntărind 17,26g și conținînd în aortă 1,43 $\pm$ 0,15% hidroxiprolină. Creșterea indicelui de fragilitate de la 1,4 la 7,0 ar reflecta multiplicarea numărului de legături intermoleculare între unitățile constitutive ale fibrelor. Dacă se administrează agenți latirogeni, cunoscuți prin acțiunea lor de a inhiba formarea acestor legături, atunci embrionul de 16 zile, deși conține aceiași cantitate de hidroxiprolină și are aceiași greutate corporală, prezintă un indice de fragilitate de numai 0,2 [640,641]. Aceste date sugerează că rezistența la *stress*-uri mecanice a peretelui arterial nu este legată numai de cantitatea de fibre de colagen, ci și de gradul lor de stabilitate structurală, acest ultim factor putînd deveni predominant. Este interesant de menționat și observația că diminuarea numărului de legături intermoleculare, rezultînd din acțiunea agenților latirogeni, nu este reflectată de aspectul histologic al fibrelor fucsinofile, în schimb apare o solubilizare mult mai rapidă în ser fiziologic [642]. Cercetările noastre în acest domeniu au evidențiat inegalitatea gradului de stabilitate structurală a unor formațiuni histologice aparent similare, dar situate în straturi diferite ale peretelui arterial. După cum se poate constata din consultarea tabelelor VI, VII și VIII, tratarea cu soluții care rup legături electrostatice și punți de hidrogen determină dizolvarea substanței fundamentale a fibrelor, colagene și a fibrelor reticulinice din intimă și lasă aparent nealterate formațiunile similare din medie.

Fig. 48 și 49 ilustrează, de asemenea, aceste observații.

Dacă, prin pretratare cu acid tanic sau formol, se introduc legături intermoleculare suplimentare, atît fibrele de colagen, cît și cele de reticulină devin rezistente la toate metodele de extracție, apărînd cu o stabili-

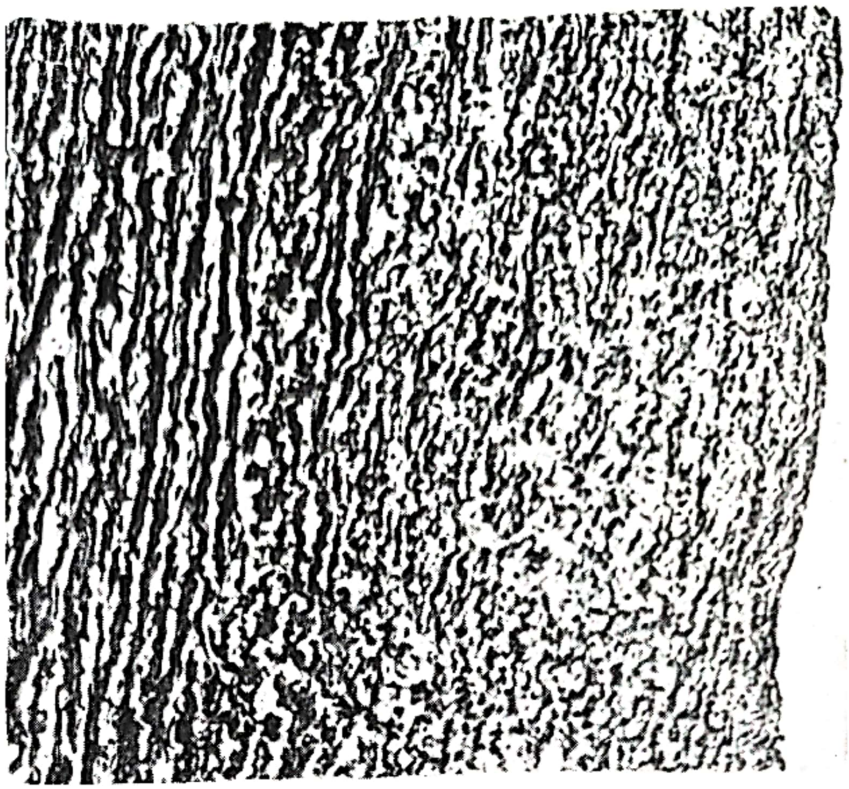
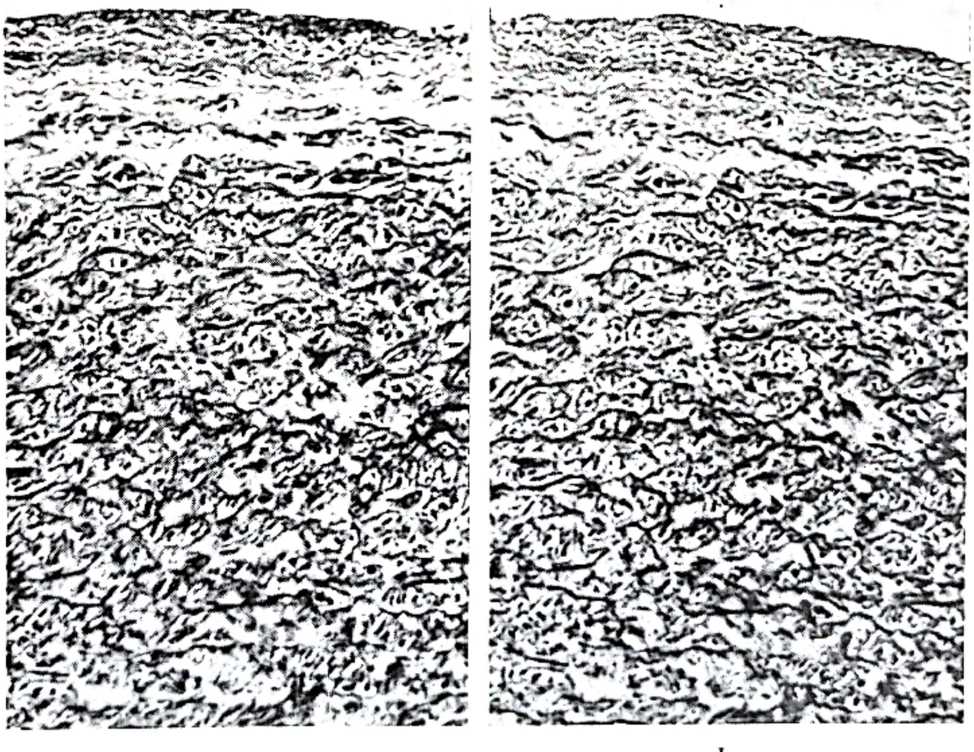


Fig. 48. Perete anterior al aortei toracice de adult. Impregnaţie argentică după digestie cu pectinază. Dispariţie importantă a materialului argintofil din intimă şi persistenţa celui din medie (× 220).



a *b*

Fig. 49. Perete anterior al aortei toracice de adult. a) Dispariţia fibrelor fucsinofile din intimă, după 6 ore de digestie cu colagenază. b) Persistenţa aceloraşi fibre după incubaţie de 6 ore cu colagenază, dar pretratate anterior cu acid tanic, spre a fi introduse legături intermoleculare artificiale (picrofucsină Van-Gieson, × 220).

Scanned with OKEN Scanner

tate structurală similară celor din media aortei. Aceste rezultate au evidenţiat că, în aorta de adult, ţesutul conjunctiv din intimă are macromoleculele constitutive mai slab interconectate, în comparaţie cu cel din media aceluiaşi vas [1108, 1110].

Mucopolizaharidele

Cantitatea de mucopolizaharide din aorta umană a apărut, la determinările biochimice, de 4,9 mg/g la copil, 4,8 mg/g la adult (între 20 şi 59 de ani) şi 2,4 mg/g la bătrîni (între 60 şi 76 de ani), cu următoarele fracţii constitutive : 24,8% hexozamine (dintre care 79% galactozamină şi 21% glucozamină), 33,3% uronaţi şi 12,2% sulfaţi, indicînd prezenţa celor trei tipuri de condroitin-sulfaţi, a acidului hialuronic şi a substanţelor de tip heparinic [296, 297]. În alte lucrări se menţionează, la adult, concentraţii de 0,85 — 1,20%, fracţia mucopolizaharidică a peretelui arterial înglobînd 2/3 condroitin-sulfaţi şi 1/3 acid hialuronic şi substanţe de tip heparinic. Trecerea de la adult la bătrîn este marcată prin scăderea cantităţii de acid hialuronic şi de condroitin-sulfat C şi prin creşterea condroitin-sulfatului B, modificări total diferite de cele întîlnite la nivelul cartilajului hialin [553]. În alte studii se notează o creştere a cantităţii globale de mucopolizaharide, care ajung să reprezinte 3,5% din totalul substanţelor constitutive ale peretelui aortic, evidenţiindu-se, o dată cu înaintarea în vîrstă, scăderea acidului hialuronic (pînă la 40% din valoarea iniţială), a condroitinului (pînă la 15% din valoarea iniţială); în schimb, se notează o creştere cu aproximativ 15% a keratosulfatului şi, cu aproximativ 50%, a condroitin-sulfatului B [170, 171, 172]. Mărirea progresivă a cantităţii de keratosulfat ar

Tabelul VI

Efectul digestiilor enzimatice şi al extracţiilor chimice asupra stabilităţii structurale a substanţei fundamentale din intima şi media aortei toracice (VELICAN C. [1103, 1110])

Pretratare înainte de coloraţia cu albastru de toluidină :	Metacromazia	
	INTIMA	MEDIA
Sialidază	diminuată neuniform	diminuată neuniform
Hialuronidază bacteriană	diminuată neuniform	diminuată neuniform
Hialuronidază testiculară	diminuată neuniform	diminuată neuniform
Pepsină (30 de minute)	diminuată neuniform	diminuată neuniform
Tripsină (30 de minute)	diminuată neuniform	diminuată neuniform
Papaină	dispărută	dispărută
Lizozim	nemodificată	nemodificată
Pectinază	nemodificată	nemodificată
NaCl 10%	intens diminuată	slab diminuată
KOH 1%	intens diminuată	slab diminuată
Apă distilată la 90°C	intens diminuată	slab diminuată
Uree 8 *M*	intens diminuată	slab diminuată
Tampon citrat (6 ore)	dispărută	intens diminuată

Tabelul VII

Efectul digestiilor enzimatice și al extracțiilor chimice asupra stabilității structurale a fibrelor de colagen din intima și media aortei toracice (VELICAN C. [1108, 1110]).

Pretratare înainte de colorația cu picrofucsina Van-Gieson :	Fucsinofilia	
	INTIMA	MEDIE
Colagenază (3 ore)	intens diminuată	nemodificată
Formol + colagenază	nemodificată	nemodificată
Acid tanic + colagenază	nemodificată	nomodificată
NaCl 10% (24 ore)	intens diminuată	nemodificată
Formol + NaCl 10%	nemodificată	nemodificată
Acid tanic + NaCl 10%	nemodificată	nemodificată
KOH 1% (24 ore)	intens diminuată	nemodificată
Formol + KOH 1%	nemodificată	nemodificată
Acid tanic + KOH 1%	nemodificată	nemodificată
Apă distilată la 90°C (15 minute)	intens diminuată	nemodificată
Formol + apă distilată la 90°C	nemodificată	nemodificată
Acid tanic + apă distilată la 90°C	nemodificată	nemodificată
Uree 8 M (24 ore)	intens diminuată	nemodificată
Formol + uree 8 M	nemodificată	nemodificată
Acid tanic + uree 8 M	nemodificată	nemodificată

Tabelul VIII

Efectul digestiilor enzimatice și al extracțiilor chimice asupra stabilității structurale a fibrelor de reticulină din intima și media aortei toracice (VELICAN C. [1108, 1110]).

Pretratare înainte de impregnația argentică	Argintofilie	
	INTIMA	MEDIE
Colagenază (3 ore)	nemodificată	nemodificată
Sialidază (24 de ore)	nemodificată	nemodificată
Lizozim (48 de ore)	nemodificată	nemodificată
Hialuronidază testiculară (24 de ore)	nemodificată	nemodificată
Pectinază (48 de ore)	neuniform diminuată	nemodificată
Pepsină (30 de minute)	neuniform diminuată	nemodificată
Tripsină (30 de minute)	neuniform diminuată	nemodificată
NaCl 10% (24 de ore)	nemodificată	nemodificată
KOH 1% (24 de ore)	nemodificată	nemodificată
Apă distilată la 90°C (15 minute)	nemodificată	nemodificată
Uree 8 *M* (24 de ore)	nemodificată	nemodificată

putea explica și diminuarea raportului galactozamină/glucozamină la bătrîni [296]. Însfîrșit, s-a constatat că în vasele care „îmbătrînesc" se acumulează mai mult acid sialic, constituind, la adult, 0,178% din țesutul umed al aortei și 0,107% din țesutul umed al coronarelor [774].

Analiza histochimică a modificărilor paternului mucopolizaharidelor acide în cursul evoluției ontogenetice a permis să se semnaleze numeroase date importante [1223]. Astfel, acidul hialuronic apare în cantități variabile în intimă și medie la feți, nou-născuți, copii și tineri, pentru a scădea evident la adulți. La nivelul coronarei, această diminuare a reactivității histochimice are loc numai la nivelul mediei, iar în bazilară nu s-a putut identifica un material cromotrop de tipul acidului hialuronic,

Scanned with OKEN Scanner

în nici o perioadă a vieţii. Condroitin-sulfaţii A şi C scad cu vîrsta în aortă, coronare şi bazilară, părînd corelaţi topografic cu fibrele colagene. Dimpotrivă, condroitin-sulfatul B devine din ce în ce mai reactiv cu cît organismul îmbătrîneşte, fiind, de asemenea, asociat cu fibrele colagene şi, în special, cu cele cu diametre deosebit de mari. Heparitin-sulfatul a apărut cu o topografie extrem de variabilă, care împiedică să fie corelat cu modificările de vîrstă. Se sugerează, tot pe baza datelor histochimice, că raportul condroitin-sulfat B/condroitin-sulfaţi A şi C ar creşte cu vîrsta şi cu severitatea alterărilor limitantei elastice interne [1223]. Scăderea cu vîrsta a acidului hialuronic şi creşterea condroitin-sulfatului B este menţionată şi de alte analize histochimice [383,1120].

Histoautoradiografic s-a notat, la om, o scădere cu vîrsta a încorporării radiosulfatului în peretele aortei, sugerînd o diminuare a sintezei de mucopolizaharide acide sulfatate [938]. Aceste date concordă cu analize biochimice care menţionează diminuarea, la bătrîni, a tuturor mucopolizaharidelor acide ce conţin grupe sulfat [603], chiar dacă unele dintre ele, cum ar fi condroitin-sulfatul B au tendinţă la creştere pînă în perioada tîrzie a vîrstei adulte.

Alte analize biochimice atrag atenţia asupra diferenţelor care există între modificările de vîrstă ale paternului mucopolizaharidelor din intima şi media aceluiaşi vas. Astfel, în media aortei, hexozaminele ar creşte semnificativ de la naştere şi pînă la al 8-lea deceniu al vieţii (de la 1 000, la 1 600 mg/100 g ţesut uscat, delipidizat şi demineralizat), pe cînd în intimă, creşterea nu este evidentă decît pînă în deceniile 5 —6 (de la 1 100, la 1 750 mg/100 g ţesut uscat, delipidizat şi demineralizat), după care urmează o scădere puţin semnificativă. În plus, s-a mai constatat că, în medie, cantitatea de acizi uronici nu se modifică cu înaintarea în vîrstă, pe cînd în intimă scade progresiv pe măsură ce organismul îmbătrîneşte [119].

O altă observaţie care trebuie luată în considerare este scăderea, cu vîrsta, a vîscozităţii relative a mixturilor de mucopolizaharide izolate din aortă [120], determinînd o creştere progresivă a gradului de permeabilitate a peretelui arterial. Diminuarea vîscozităţii evoluează paralel cu mărirea valorilor condroitin-sulfaţilor şi a raportului condroitin-sulfaţi/acid hialuronic, sugerînd că ar rezulta din degradarea acidului hialuronic. În legătură cu acelaşi subiect, amintim şi constatarea că gradul de polimerizare a acidului hialuronic din aortă nu pare influenţat de vîrsta subiectului, dar că, în general, acest mucopolizaharid are, în aortă, o greutate moleculară mai redusă, decît în alte ţesuturi [121].

Glicoproteinele

Primele cercetări în acest domeniu au evidenţiat, în aorta de om, două fracţii cu grad diferit de solubilitate, prima formînd cu apa soluţii vîscoase, a doua, soluţii cu vîscozitate extrem de redusă. Evoluţia lor

cantitativă, în funcție de vîrstă, se reflectă în următoarele procente, raportate la greutatea peretelui arterial, uscat și delipidizat [117]:

Vîrsta	*Fracția I*	*Fracția a II-a*
7 luni	3,3	3,1
2 ani	5,3	4,2
45 de ani	11,4	4,9
58 de ani	14,4	5,4
60 de ani	14,6	6,2

Se poate constata o creștere cu vîrsta, mult mai marcată pentru fracția greu solubilă. Corelarea creșterii glicoproteinelor cu aceea a mucopolizaharidelor acide, la nivelul aceluiași fragment de aortă, a dus la rezultatele următoare [117]:

Vîrsta	*Mucopolizaharide* (mg/100 g țesut uscat)	*Glicoproteine* (mg/100 g țesut uscat)
7 luni	262	128
2 ani	358	137
45 de ani	550	156
60 de ani	625	176

Ar rezulta din aceste date o creștere mult mai netă, în peretele aortei care „îmbătrînește", a cantității de mucopolizaharide acide, în comparație cu glicoproteinele.

Din punct de vedere histochimic, materialul PAS-reactiv ce persistă după extracția lipidelor din peretele vascular, considerat a fi constituit din glicoproteine, prezintă afinități ce variază de la o arteră la alta și, chiar, între intima și media aceluiași segment vascular. Astfel, s-au notat creșteri aparente în intima aortei, în primele două decenii ale vieții, urmate de paternuri nemodificate pînă în deceniul al 5-lea, cînd pot fi vizualizate aspecte sugerînd noi acumulări cantitative. Aceleași variații, dar mai discrete, au fost observate și în media aortei. În coronare, primele acumulări mai nete apar, în medie, între al 2-lea și al 4-lea deceniu, în timp ce, în intimă, se întîlnesc mult mai tîrziu, între deceniile 4 și 7. În media femuralei apar creșteri în deceniile 2 — 5, în timp ce, în intimă, nu pot fi vizualizate modificări cantitative în tot cursul evoluției ontogenetice. Însfîrșit, în artera pulmonară, substratele PAS-reactive devin mai abundente, în medie, în deceniile 2—3 iar în intimă, în al 4-lea [370]. Comparînd aceste date cu intensitatea legării maxime a cationilor de colorant(indicînd o reactivitate histochimică maximă a mucopolizaharidelor acide) se constată, pe același material de studiu, cea mai mare acumulare a acestor substanțe: pentru coronare în deceniile 2 — 3; pentru femurală, deceniul al 3-lea pentru medie și al 8-lea, pentru intimă; pentru artera pulmonară, al 8-lea deceniu, pentru ambele straturi [370]. Rezultă că nici histochimic nu se pot face corelări între modificările de vîrstă ale organizării macro-

moleculare a mucopolizaharidelor acide şi glicoproteinelor, aşa cum nu s-au putut stabili nici prin metode biochimice.

Importanţa glicoproteinelor în structura morfofuncţională a peretelui vascular a fost mult timp subestimată, datorită concentrării cercetărilor asupra variaţiilor cantitative şi calitative ale mucopolizaharidelor acide. Absenţa unor rezultate încurajatoare din studiul mucopolizaharidelor acide au îndreptat atenţia biochimiştilor asupra rolului glicoproteinelor în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv din peretele vascular. O observaţie importantă a fost constatarea că glicoproteinele se găsesc, de multe ori, în concentraţii ce depăşesc pe acelea ale mucopolizaharidelor acide şi că alcătuiesc complexe macromoleculare cu proprităţi imunologice specifice: *tissue typing* [112]. Ar exista şi glicoproteine cu particularităţi fizico-chimice specifice pentru o anumită perioadă a evoluţiei ontogenetice, evidenţiabile, de exemplu, la făt şi absente la adult [328]; anumite tipuri de glicoproteine vasculare ar fi detectabile numai la masculi şi ar lipsi la femele. Toate aceste rezultate au permis să se sugereze existenţa unor „familii" de glicoproteine vasculare, a căror semnificaţie biologică rămîne să fie precizată. Analize biochimice menţionează că aceste glicoproteine ar conţine 67% polipeptide, 7,11% acid sialic şi cantităţi mai mici de glucozamină, glucoză, galactoză şi fucoză [109]. Tot pe baza analizelor biochimice se afirmă că perioada de acumulare maximă în peretele aortic este situată între 7 şi 22 de ani [332].

Consideraţii morfo-funcţionale

Lucrările actuale privind influenţele exercitate de îmbătrînirea organismului asupra capacităţii funcţionale a arterelor au avut ca punct de plecare observaţii ce datează de aproape un secol [921]. Ele au atras atenţia că, o dată cu înaintarea în vîrstă, peretele arterial devine mai puţin distensibil la presiunea intralumenală. Ulterior, s-a demonstrat că această alterare a capacităţii visco-elastice şi de rezistenţă mecanică a vasului poate fi evidenţiată cu o anumită constanţă la sfîrşitul celui de al 2-lea deceniu al vieţii, intensificîndu-se apoi progresiv, către bătrîneţe. Ea ar apare indiferent de sex, presiunea diastolică a sîngelui, grosimea peretelui arterial, prezenţa eventuală de leziuni aterosclerotice şi cauza care a dus la exitus [1205]. Alte lucrări au completat aceste date cu constatarea că dependenţa de vîrstă se reflectă, în primul rînd, în diminuarea capacităţii de distensie în direcţia longitudinală, care apare în mod uniform pentru acelaşi segment vascular, afectează toţi subiecţii de vîrste similare şi nu poate fi corelată cu gradul îngroşării intimei [1183]. Acest deficit de extensibilitate a fost atribuit în proporţie de 80% alterărilor structurilor musculo-elastice şi de 20%, fibrozei [593].

Cercetări recente au deschis orizonturi noi de investigaţie prin corelarea unor observaţii efectuate asupra macromoleculelor ţesutului conjunctiv al arterelor, cu observaţii efectuate asupra polimerilor sintetici cu

Scanned with OKEN Scanner

proprietăți elastice [739]. În lumina acestor rezultate, alterările de vîrstă ale peretelui arterial au căpătat noi perspective de înțelegere. Astfel, s-a demonstrat că mucopolizaharidele acide din substanța fundamentală a intimei și mediei, acționează ca factori de diluare și de „plasticizare" a fibrelor colagene, sugerîndu-se că orice modificare cantitativă sau calitativă a mucopolizaharidelor, influențează comportamentul lor visco-elastic [739]. De asemenea, s-a sugerat că substanța fundamentală interacționează și cu elementele elastice, musculare și reticulinice, prin aceiași particularitate de *good solvents* (buni solvenți). Efectele unor astfel de interacțiuni se traduc prin : *a*) scăderea numărului de lanțuri macromoleculare ce suportă *stress*-ul mecanic sau hemodinamic pe unitatea de volum ; *b*) creșterea extensibilității fibrelor la stimulii din afară și a capacității lor de hidratare. Se pot creia astfel condiții de adaptare inadecvată, favorizîndu-se ruperea fibrelor.

Aceste date, izvorîte din studiul chimiei polimerilor, sînt susținute de observații infrastructurale, care atestă interrelațiile morfologice ale elementelor constitutive ale peretelui arterial. Ele apar evidente în condiții de *stress*, cînd fibrele de colagen constituie elementul de rezistență la tracțiune prin lipsa lor de extensibilitate, în timp ce, lamele elastice distribuie uniform *stress*-ul pe toată circumferința peretelui arterial. În lumina acestor observații, peretele arterial a fost considerat ca un polimer cu „două faze" [386], incluzînd două tipuri de organizare macromoleculară, cu rezistențe mecanice și moduli de elasticitate diferite : fibrele de colagen și fibrele elastice. Ceilalți constituenți macromoleculari, apărînd sub aspectul fibrelor reticulinice, membranelor bazale, substanței fundamentale și miofibrilelor sînt integrați în cele două faze ale biopolimerilor principali. Într-un astfel de polimer complex, modulul de elasticitate este mai mic decît al fibrei de colagen izolate, în schimb rezistența la *stress*-uri mecanice este mai mare, datorită faptului că există posibilitatea distribuirii uniforme a acestor *stress*-uri, prin prezența fibrelor elastice ; pe de altă parte, prezența fibrelor de colagen inextensibile face ca modulul de elasticitate să fie mai ridicat, decît cel al lamelor elastice izolate.

Cînd structurile colagene și elastice au o organizare macromoleculară nealterată, peretele arterial va prezenta un modul de elasticitate apropiat de cel al țesutului conjunctiv. La microscop, această adaptare funcțională este reflectată prin aspectul ondulat al fibrelor la presiuni intralumenale coborîte, cu distanțe interlamelare mai mari și prin aspectul rectiliniu al fibrelor la presiuni ridicate, cu diminuarea spațiilor interlamelare. Cînd presiunea în lumenul arterei crește, lamele elastice se subțiază, iar fibrele de colagen au tendința de a se dispune circular, limitînd distensia peretelui. Se poate deci considera că media arterelor funcționează ca o unitate viscoelastică și că modificările de vîrstă ale organizării macromoleculare, menționate în paginile anterioare pentru fiecare component în parte, afectează capacitatea de adaptare a întregului perete arterial. Ele duc, în primul rînd, la răspunsuri inadecvate față de variațiile de presiune intralumenală și, în special față de microtraumatismul exercitat ritmic de către unda pulsatilă.

Scanned with OKEN Scanner

Creşterea, cu vîrsta, a numărului de legături încrucişate în fibrele de colagen ale arterelor şi mărirea rezistenţei lor la *stress*-uri mecanice, asociată cu scăderea extensibilităţii, au fost corelate cu rolul bătrîneţii în apariţia hipertensiunii arteriale [901]. S-au propus ,în acest sens, şi „indici" de rigiditate arterială, care ar reflecta creşterea cu vîrsta a rezistenţei peretelui la modelarea cerută de factorii hemodinamici [2,233]. Pe baza acestui test, mulţi autori au ajuns la concluzia că la majoritatea pacienţilor cu hipertensiune arterială denumită „esenţială", presiunea diastolică ridicată ar fi consecinţa modificărilor de vîrstă ale arterelor.

Problema influenţei bătrîneţii asupra capacităţii funcţionale a vaselor se reflectă cel mai grav în domeniul circulaţiei cerebrale. Ea este exteriorizată de o simptomatologie extrem de variată, incluzînd greutatea de fixare a atenţiei, incapacitatea de concentrare, pierderea memoriei, schimbări ale personalităţii. Această simptomatologie nu se însoţeşte, de cele mai multe ori, şi de deficite neurologice, fiind asociată cu stări de iritabilitate, agitaţie sau depresiune. Ea are, deseori, ca substrat morfologic, alterările de vîrstă ale carotidei, vertebralei şi bazilarei. Studii hemodinamice atestă o alterare a capacităţiilor visco-elastice ale arterelor menţionate, rezultînd o deficienţă de oxigenare, asociată cu dereglări ale circulaţiei colaterale şi compensatorii. De aceea, efectele senescenţei asupra peretelui arterial trebuiesc cercetate sub un orizont cît mai larg, plecîndu-se de la circulaţia sistemică şi ajungîndu-se la particularităţile hemodinamice ale fiecărui segment vascular [16].

În acest sens, ar fi dorit ca, în viitor, să se acorde o importanţă mai mare analizei modificărilor de vîrstă în organizarea macromoleculară a peretelui venelor. Creşterea cantităţii de elastină şi de hexozamină şi scăderea celei de colagen, constatată în dilataţiile varicoase [1052], reprezintă primele date ce le avem pînă acum în acest vast cîmp de investigaţie. Interesul ni se pare şi mai mare dacă se ia în consideraţie constatarea, general admisă, că varicele primar apare frecvent la pacienţi care au şi picior plat, hernii, hemoroizi etc., sugerînd un defect mai general în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv.

Am dori însă să subliniem că modificările de vîrstă în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv din peretele vaselor trebuiesc asociate nu numai cu alterările hemodinamice, ci şi cu cele metabolice. Întrucît toate structurile constitutive ale acestui perete se găsesc sub controlul activităţilor celulare, atît din punctul de vedere al sintezei, cît şi al degradării şi remodelării, modificările în metabolismul celular se vor reflecta în cantitatea şi în calitatea produşilor elaboraţi, precum şi a factorilor de degradare. În acest sens, menţionăm că s-a constatat, o dată cu înaintarea în vîrstă, o reducere progresivă a consumului de oxigen din peretele arterial şi o creştere a cantităţii de acid lactic, sugerînd o mărire a glicolizei anaerobe şi o diminuare a respiraţiei celulare. Această transformare are drept consecinţă o reducere a randamentului energetic, reflectat de scăderea adenozintrifosfatului şi a altor compuşi bogaţi în energie rapid disponibilă. Ulterior, se reduce şi cantitatea de acizi aminaţi

Scanned with OKEN Scanner

activați, de nucleotizi adenilici și de alte substanțe necesare sintezei proteinelor enzimatice și neenzimatice, inclusiv a acizilor ribonucleici [696]. Plecîndu-se de la constatarea că arterele dispun în general de un echipament enzimatic relativ modest (permițînd un metabolism energetic cu randament puțin eficient) se susține că modificările de vîrstă accentuează această carență de energie, prin acțiunea unor factori mecanici, toxici, infecțioși etc. asupra activităților enzimatice. Reducerea energiei disponibile micșorează ritmul sintezei proteinelor, mai ales a celor de tipul enzimelor, intensificînd diminuarea producerii de energie. Această stare de „asfixie cronică" a peretelui arterial, cu predominența progresivă a metabolismului anaerob, determină perturbări în sinteza și remodelarea tuturor tipurilor de macromolecule. Apare astfel, cu claritate, cît de complexă este „patologia vîrstei înaintate", raportată la peretele arterial, cît de variate sînt nivelurile la care apar dereglările și cît de mult influențează, fiecare alterare în parte, toate formele de organizare macromoleculară. Acumularea datelor de care dispunem astăzi, dintre care o mare parte au fost prezentate în acest subcapitol, permite o înțelegere mai bună a creșterii logaritmice a curbei mortalității începînd din al 3-lea deceniu, cu precădere pentru bolile care afectează peretele arterial. În același timp, apare cu claritate stringența ca terapeutica preventivă să fie orientată în conformitate cu aceste date noi.

CORD

Fibroza miocardului la bătrîni este menționată la aproximativ 10% din examenele necropsice, deși se pot face rezerve dacă reprezintă numai rezultatul apariției senesecenței sau/și consecința unor leziuni coronariene și procese inflamatoare. Cercetările de biochimie asupra miocardului, cu aspect normal macro- și microscopic, efectuat pe grupe de vîrstă, nu au putut evidenția variații, semnificative din punct de vedere statistic, ale conținutului în hidroxiprolină, cu excepția primului deceniu al vieții, în cursul căruia colagenul atinge cantitățile cele mai ridicate, ajungînd pînă la 5,42 μg de hidroxiprolină/mg de țesut [1170]. Absența unei corelații între vîrstă și cantitatea de colagen din miocard este menționată în toate lucrările efectuate pînă acum asupra acestui subiect. Datele de care dispunem sugerează, deci, că fibroza „senilă" a miocardului nu este consecința unei creșteri importante a numărului de fibre colagene, ci mai curînd a colapsului rețelelor reticulinice, în zonele de degenerare celulară [256], precum și a altor factori asociați.

În ceea ce privește mucopolizaharidele acide, se susține fie că nu ar exista variații cantitative, statistic semnificative, în cursul îmbătrînirii [1170], fie că apar scăderi importante ale cantităților de hexozamine și acizi uronici, la vîrste înaintate [220].

În lumina datelor de mai sus, îmbătrînirea miocardului pare mai mult legată de acumulările de pigment în celulele contractile, studiul

acestui aşa-zis material de uzură neintrînd în subiectul discuţiilor noastre.

La nivelul valvulelor cardiace, observaţii efectuate de anatomopatologi încă de la sfîrşitul veacului trecut, menţionează îngroşări ale marginilor valvulare, cu atît mai evidente cu cît vîrsta este mai înaintată. Se produce, de asemenea, o accentuare a aspectului neregulat, cu acumulare de mici noduli de a lungul liniei de închidere a valvulelor. Aceste alterări de vîrstă sînt mai puţin nete la nivelul tricuspidei, în comparaţie cu mitrala, precum şi la nivelul valvulelor arterei pulmonare, în comparaţie cu cele aortice, sugerînd că ar rezulta, în primul rînd, din intensitatea traumatismului hemodinamic. Se mai adaugă, la mulţi bătrîni, îngroşări ale inelelor valvulare, calcificări şi ferestruiri ale marginilor libere. Examenul microscopic permite să se vizualizeze : *a*) o hiperplazie a ţesutului elastic pe suprafaţa de scurgere a valvulelor şi formarea de mici insule de scleroză în jurul liniilor de închidere ; *b*) creşterea numărului de fibre colagene şi elastice în spongioasă, cu formarea de plăci hialine ; *c*) tendinţă la coalescenţa elementelor fibrilare din cordaje şi comisuri [725]. Progresiunea alterărilor fibroase poate fi explicată, pentru fiecare valvulă în parte, în funcţie de microtraumatismele hemodinamice la care este supusă. De asemenea, calcificările par a fi mai frecvente în zonele intens solicitate. La microscopul electronic se evidenţiază nu numai o intensificare a densităţii structurilor fibrilare colagene, dar şi o modificare în diametrul fibrelor, la bătrîni apărînd predominente cele cu o grosime de 300—400 Å, faţă de 100—120 Å la tineri. În plus, orientarea lor tinde să devină cît mai paralelă, uşurîndu-se astfel formarea de fascicole groase. În ceea ce priveşte fibrele elastice, s-a constatat cu înaintarea în vîrstă o reducere a diametrului nucleului central elastinic şi o îngroşare a tecii periferice mucoproteică [782]. Alterarea structurală a fibrelor elastice şi compactizarea structurilor colagenice ar putea explica deformările valvulelor care apar la bătrîni, alungirea cordajelor, defectul de închidere prin dilatarea inelelor etc. Analizele biochimice menţionează nu numai creşterea cantitativă a colagenului, ci şi o multiplicare anormală a legăturilor intermoleculare, valvulele cardiace de bătrîn conţinînd fibre mai rigide şi mai deshidratate, dar, în acelaşi timp, mai uşor degradabile prin variaţiile de pH şi concentraţie ionică [1077]. În alte studii se atrage atenţia asupra creşterii colagenului numai pînă în al 6-lea deceniu al vieţii, după care scade cu aproximativ 20% din valoarea de la adult [80].

În ceea ce priveşte mucopolizaharidele, o dată cu înaintarea în vîrstă s-au notat scăderi ale acidului hialuronic şi condroitin-sulfatului A şi C şi creşteri ale condroitin-sulfatului B, modificări care au fost corelate cu cele întîlnite la nivelul peretelui arterial [759]. S-au notat, de asemenea, diminuări cantitative ale mucopolizaharidelor totale, mai evidente în valvulele aortice, în comparaţie cu mitrala [80].

PLĂMÎNI

Plămînii funcţionează în tot cursul vieţii sub acţiunea unor *stress*-uri ciclice, determinate de diferenţa dintre presiunea intratoracică şi

Scanned with OKEN Scanner

cea intraalveolară. În plus, datorită comunicării directe cu mediul exterior, se găsesc în mod constant supuși la variante microtraumatisme legate de inhalarea aerosolilor. De aceea, studiile asupra uzurii suferite o dată cu înaintarea în vîrstă, au constituit și constituie o continuă preocupare. Subiectul principal al acestor studii este compararea leziunilor de bătrînețe, cu cele ale emfizemului, a căror similaritate a fost afirmată, pe baza examenelor macroscopice și microscopice, cu mai multe decenii în urmă. Experiența acumulată în acest domeniu a determinat pe anumiți cercetători să susțină, că, examenul necropsic este insuficient pentru a putea individualiza ce alterări se datoresc bătrîneții, și care au la bază apariția emfizemului. În ambele cazuri se constată o creștere a diametrelor toracelui, asociată cu semne similare clinice și radiologice, indicînd o mărire a spațiului ocupat de căile aeriene terminale. Explorările funcționale au evidențiat, însă, unele diferențe în ceea ce privește viteza de scurgere a coloanei de aer, distribuția intrapulmonară a gazelor, capacitatea de difuziune etc., mărind interesul pentru aceste investigații. Problema în ansamblul ei rămîne însă greu de rezolvat, datorită timpului îndelungat necesar apariției emfizemului, timp ce se poate întinde pe mai multe decenii și care, în mod inevitabil, se suprapune cronologic procesului de îmbătrînire. În astfel de condiții este dificil de separat dacă anumite zone de distensie a parenchimului, de atrofie a pereților alveolari, de fibroză interstițială, de alterări ale fibrelor elastice sau de arterioloscleroză sînt determinate de microtraumatismele acumulate în cursul vieții, sau de un proces patologic suprapus, pe care îl denumim emfizem pulmonar. Dificultatea este și mai mare atunci cînd se constată mărirea progresivă a severității emfizemului, cu cît vîrsta este mai înaintată și cu cît apar mai frecvent puseuri inflamatoare la nivelul căilor aeriene inferioare.

Considerînd că procesul de respirație rezultă din acțiunea motrice toracodiafragmatică ce, prin intermediul modificărilor presiunii intratoracice, determină extensibilitatea structurilor integrate în pereții căilor aeriene și parenchimului pulmonar, efectul înaintării în vîrstă asupra aparatului respirator trebuie analizat la niveluri foarte variate. Limitînd analiza noastră doar la formațiunile care aparțin țesutului conjunctiv, menționăm, pe primul plan, parenchimul respirator și cartilagiile din căile aeriene și cutia toracică. Modificările din cartilaje vor fi prezentate în subcapitolul următor, împreună cu cele care apar la nivelul articulațiilor, întrucît există multe aspecte similare. În consecință, ne vom centra asupra parenchimului pulmonar și, mai ales, asupra peretelui alveolar, considerat de mulți cercetători ca teritoriul unde s-ar manifesta cel mai evident alterările determinate de senilitate, datorită continuei suprasolicitări de-a lungul întregei vieți.

Strînsa asociere între rețelele de fibre elastice și colagene și, mai ales, dezvoltarea mai abundentă a acestora din urmă în plămînul de adult, a determinat pe anumiți cercetători să susțină că rolul dominant în mecanica plămînului este jucat de fibra colagenă, elementele elastice avînd o importanță secundară. Această afirmație, care contrazice datele clasice ce atribuiau elasticitatea plămînului fibrelor formate din macromolecule de

Scanned with OKEN Scanner

elastină, este susţinută de numeroase date experimentale. Se admitea că fibrele elastice au o mare extensibilitate care permite distensia plămînului, că au un modul elastic redus care uşurează revenirea la volumul iniţial cînd forţa de distensie încetează şi că aceste calităţi se datoresc modului de organizare macromoleculară a fibrelor, conţinînd unităţi fără nici un grad de cristalinitate. O primă îndoială asupra rolului absolut, atribuit fibrelor elastice în mecanica plămînilor, a apărut o dată cu lucrările ce au demonstrat că, dacă se umplu cu lichid spaţiile aeriene, se poate dovedi că elasticitatea parenchimului este responsabilă doar de 1/3 — 1/4 din forţa de retracţie a plămînului plin cu aer. Restul forţei de retracţie s-ar baza pe dispoziţia helicoidală, atît a alveolelor în jurul canalelor alveolare, cît şi a fibrelor reticulinice, colagenice şi elastice, în jurul căilor aeriene terminale şi al vaselor. În astfel de condiţii, plămînul se întinde atît cît îi permite trecerea de la forma helicoidală, la forma întinsă a fibrelor colagene, care, fiind inextensibile, contracarează forţa de distensie. Cînd această forţă a încetat întregul complex alveolar destins revine la dispoziţia helicoidală, ca un arc tracţionat. Expansiunea plămîntului ar avea astfel loc ca urmare a „deşurubării" complexelor alveole-căi aeriene terminale, iar revenirea la volumul iniţial, prin refacerea helixurilor ductulare [847]. Această ipoteză ar explica mai satisfăcător de ce, deşi există o creştere a cantităţii de fibre elastice din plămîni o dată cu înaintarea în vîrstă, capacitatea funcţională a organului este progresiv alterată. Acest deficit funcţional rezultă din faptul că fibrele elastice se înmulţesc în afara alveolelor, respectiv în pereţii căilor aeriene şi în zonele subpleurale şi nu pot, astfel, participa la ameliorarea schimburilor dintre capilarul alveolar şi aerul inspirat.

Un alt component al organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv al plămînului, a cărui modificare în raport cu vîrsta ridică numeroase probleme, este complexul alcătuit din fibrele de reticulină şi membrane bazale. S-ar putea afirma că, dintre toate structurile peretelui alveolar, cele care apar mai net alterate la microscopul optic sînt aceste complexe, care, la bătrîni, prezintă îngroşări şi condensări neregulate, reduplicări, fragmentări şi discontinuităţi. Fibrele de reticulină din plămîni ar reprezenta agregate complexe, conţinînd, într-un material ciment de natură încă neprecizată, fibrile colagene primare, cu diametru de 200 — 250 Å [864]. Materialul ce înconjoară pachetul de fibrile colagene, atunci cînd vine în contact cu membrana bazală, pare a se continua cu aceasta, dînd impresia că fibrilele fac parte integrantă din aceste membrane. Fibrele de reticulină cele mai fine, la limita vizibilităţii microscopului fotonic, conţin 4 — 10 fibrile de colagen şi ajung la un diametru de 0,2 — 0,6 μ. Cele mai mature ar cuprinde 50 — 60 de fibrile, iar diametrul lor poate depăşi un micron.

Dacă acest mod de organizare macromoleculară este, în general, acceptat, există încă multe nelămuriri asupra modului cum sînt alcătuite membranele bazale din peretele alveolar. La microscopul electronic s-a indentificat o membrană bazală a capilarului, cu un diametru 300—500Å cu aspect dens şi omogen, prezentînd, pe de o parte, zone unde se subţiază pînă la 100 Å şi, pe de altă parte, o margine mai neregulată în zona

Scanned with OKEN Scanner

de contact cu celulele endoteliale, care trimit prelungiri protoplasmatice ce se lipesc de membrana bazală. Această structură ar fi separată printr-un spațiu conținînd un anumit tip de substanță fundamentală, de o a doua membrană bazală, situată sub celulele alveolare. Substanța fundamentală întinzîndu-se pe o grosime de numai o fracție de micron, are conținut neomogen, uneori vag fibrilar, alternînd cu prezența unor fibrile colagene bine individualizate, izolate sau grupate, considerate a face parte din rețelele reticulinice. În ceea ce privește membrana bazală alveolară, ar avea o grosime de 100—300 Å, ar fi mai densă la electroni decît cea capilară și ar fi responsabilă de reactivitatea peretelui alveolar la tratarea cu PAS [865]. Nu toți autorii sînt de acord cu prezența membranei bazale alveolare, multe imagini electronomicroscopice demonstrînd că nu ar exista formațiuni macromoleculare organizate între celula alveolară și peretele capilar [573]. Acest spațiu este considerat o zonă pericapilară plină cu lichid, în care pot exista fibrile de colagen și structuri reticulinice sau elastice, dar nu se văd densificări structurale de tipul membranei bazale.

În lumina acestor date de morfologie, semnificația analizelor biochimice, corelate cu înaintarea în vîrstă, este destul de greu de interpretat.

Colagenul ar crește, de la 12%, la 24% din totalul țesutului pulmonar în primele două decenii ale vieții, apoi ar rămîne la valori care nu prezintă variații semnificative din punct de vedere statistic, chiar la vîrstele cele mai înaintate [173]. Absența creșterii cantității de colagen din plămîni, o dată cu îmbătrînirea, este menționată și de alți autori. S-a notat, însă, o diminuare a susceptibilității la colagenază, cu cît vîrsta este mai înaintată [329], sugerînd o creștere progresivă a legăturilor intermoleculare. Acest proces este cu atît mai net, cu cît există un grad mai avansat de emfizem. Analiza aminoacizilor constitutivi indică, la copii, o predominanță a acizilor aspartic și glutamic, argininei, în comparație cu adulții, dar nu s-au notat diferențe între adulți și bătrîni.

În ceia ce privește elastina, a fost studiată de aproape trei decenii, atrăgîndu-se atenția asupra creșterii cantitative, o dată cu îmbătrînirea deși se constatase că elasticitatea plămînului scade, cu cît vîrsta este mai înaintată. Cercetări ulterioare au confirmat primele rezultate, privind creșterea elastinei în plămîni în cursul evoluției ontogenetice, cantitatea maximă fiind evidențiată în perioada senescenței [941]. Mai ales între 25 și 75 de ani, apare o dublare a cantității acestor macromolecule, sugerîndu-se că tracțiunea ritmică, exercitată în cursul fiecărei inspirații, ar interveni ca stimul de neoformație a fibrelor elastice [846]. Această ipoteză este, în parte, susținută de absența fibrelor elastice în cicatricele imobile și de existența unui mare număr de astfel de fibre în cicatricele miocardului, pericardului, pleurei și ale tuturor structurilor supuse la extensii și retracții ritmice [178]. În aceste cicatrici, fibrele elastice se dispun paralel cu forțele de tracțiune. În plămîn, în copilărie și la adultul tînăr, ele predomină în pereții alveolari, mai ales la nivelul locului de inserție a alveolei; ulterior însă, suferă un proces de degenerescență, în timp ce se înmulțesc

Scanned with OKEN Scanner

în zonele mai intens solicitate de ritmicitatea mişcărilor respiratorii: pereţii căilor aeriene terminale, pereţii vasculari, zonele subpleurale. De aceea, la bătrîn, spre deosebire de tînăr, există mai mult ţesut elastic în afara alveolelor, decît în pereţii lor [847], cu toate consecinţele funcţionale ce pot fi deduse din această inversare a predominanţei cantitative a fibrelor. Analiza diferitelor componente ale acestor fibre a evidenţiat la copil că materialul obţinut după tratare cu elastază conţine o cantitate mai mare de acid sialic, decît la adult [331]. S-au mai notat scăderi, cu înaintarea în vîrstă, a acizilor aminaţi implicaţi în producerea legăturilor intermoleculare, media cantităţii de desmozină fiind de 0,63 ± ± 0,08% la 24 ani şi de numai 0,39 ± 0,08% la 75 de ani, iar cea de izodesmozină de 0,52 ± 0,10% la 14 ani şi de 0,39 ± 0,08% la 75 de ani[848]. La bătrînii cu emfizem accentuat ar creşte conţinutul elastinei în acizi aminaţi bazici, aromatici, precum şi a acizilor aspartic şi glutamic [329].

Hexozamina a fost găsită în cantitate de 0,31% între 0 şi 5 ani, 0,54% între 50 şi 58 de ani şi 0,43% între 61 şi 77 de ani, sugerînd o creştere spre bătrîneţe, urmată de o scădere importantă [173]. Analiza variatelor fracţii conţinînd hexozamină a permis să se constate că 40—60% din mucopolizaharidele acide sînt constituite de către condroitin-sulfaţi, 20—40% de către acidul hialuronic, iar 10 % din substanţe heparinice. Glicoproteinele cuprind doar 13 — 19% din hexozaminele totale, incluzînd în plus galactoză, manoză şi fucoză, în raport de 10 : 2 : 1. Cantitatea de glicoproteine creşte cu vîrsta. În ceea ce priveşte mucopolizaharidele acide, acidul hialuronic se reduce de la 40,8% la 18 ani, la 26,9%după 60 de ani; heparina diminuă, de asemenea, de la 1,5% la 18 ani, la 0,8% la 30 de ani; condroitin-sulfaţii, în schimb, prezintă o tendinţă de creştere, ceea ce ar explica modificarea cu vîrsta a raportului acid hialuronic/condroitin-sulfaţi, raport ce descreşte progresiv [173]. În legătură cu această ultimă observaţie, menţionăm că s-a susţinut că acidul hialuronic alcătuieşte în plămîni complexe visco-elastice cu fibrele de colagen şi că, o dată cu înaintarea în vîrstă, scăderea cantităţii acestui mucopolizaharid, contribuie la alterarea proprietăţilor funcţionale ale parenchimului respirator şi la apariţia emfizemului [323]. Tot ca o reflectare a diminuării cantităţii de acid hialuronic, este şi schimbarea, cu înaintarea în vîrstă, a raportului glucozamină/galactozamină de la 0,230 la adult, la 0,170 la bătrînul emfizematos. Toate aceste date sugerează o modificare destul de importantă a organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv, reflectată la nivelul fibrelor şi a substanţei fundamentale, şi care poate constitui un suport biochimic pentru înţelegerea alterărilor morfologice şi funcţionale care apar în cursul îmbătrînirii organismului.

CARTILAJ

Modificările de vîrstă ale cartilajului reprezintă un subiect care s-a impus tot mai mult atenţiei cercetătorilor în cursul ultimului deceniu, datorită corelaţiei complexe ce s-a putut stabili între aceste modificări,

Scanned with OKEN Scanner

pe de o parte, şi apariţia osteoartrozelor, erodărilor de suprafeţe articulare, discopatiilor, calcificărilor anormale şi a emfizemului pulmonar, pe de altă parte.

În etiologia osteoartrozelor primare, *stress*-urile funcţionale şi traumatismele acumulate în cursul vieţii au fost, în trecut, considerate ca singurul factor principal. Recent, procesul s-a dovedit mult mai complex, anumite rezultate experimentale ignorînd, chiar, acţiunea factorilor mecanici.

Independent de această complexitate a factorilor etiopatogenici, este unanim admis că numărul şi severitatea osteoartrozelor cresc progresiv cu vîrsta. Astfel, dintr-un studiu cu acest subiect, menţionăm constatarea absenţei leziunilor cu gradul II — IV la indivizi între 24 şi 44 de ani, apariţia acestor grade, mai severe, între 45 şi 64 de ani şi predominanţa gradelor maxime, III şi IV, după vîrsta de 65 de ani [230].

Se admite că procesul alterativ începe cu leziuni distructive în fibrele şi substanţa fundamentală a cartilajelor articulare dar nu se poate încă preciza dacă acest proces trebuie considerat consecinţa unei alterări în metabolismul condrocitelor. Aceste celule ar putea să sintetizeze o substanţă fundamentală inadecvată, dar este tot atît de uşor de admis că, o modificare a matricei, ar putea creia condiţiile unei funcţionări inadecvate a condrocitelor. Rămîne, de asemenea, să se precizeze, în viitor, dacă teritoriile care prezintă gradul cel mai avansat de alterare în organizarea macromoleculară se găsesc în zonele cele mai intens traumatizate ale cartilajului articular şi dacă aceste alterări sînt condiţionate de tulburări ale circulaţiei sanguine. Majoritatea autorilor acceptă astăzi, cu destulă uşurinţă, ideia de „articulaţie uzată", rezultînd din microtraumatisme ce se acumulează cu fiecare mişcare, deşi nu există încă dovezi ştiinţifice bine documentate în acest sens. Este semnificativ din acest punct de vedere, rezultatul unor investigaţii experimentale, atestînd că la şoarecii care îmbătrînesc, cu o continuă solicitare anormală a articulaţiilor, nu apar leziuni mai grave în cartilajul articular, în comparaţie cu lotul martor [624]. Fără a se putea deci preciza teritoriul de cartilaj unde încep alterările de vîrstă şi dacă modificările iniţiale sînt celulare sau extracelulare, se admite astăzi că, după ce a încetat perioada de creştere, cartilajul articular suferă o remodelare a organizării macromoleculare, care se accentuează cu vîrsta şi care reprezintă substratul morfologic al osteoartrozelor [998]. La apariţia acestei remodelări contribuie factori genetici, nutriţionali şi mecanici, schimbări ale constelaţiei endocrine, ca şi anumite particularităţi tisulare locale, fiecare în parte influenţînd ritmul şi intensitatea dezvoltării leziunilor. Din acest punct de vedere trebuie subliniat rolul agravant al menopauzei şi al hipotiroidismului [996], sugerînd importanţa acţiunii hormonilor. La om, pe grupe de vîrstă similare, femeile apar mult mai des afectate decît bărbaţii, pe cînd, în modelele experimentale, sînt mai grav lezaţi masculii, decît femelele [995, 1019]. Datele acumulate pînă acum ar sugera că apariţia osteoartrozelor este grăbită de hormonul somatotrop, de testosteron, de progesteron (la masculii castraţi), precum şi de distiroidii, de regimul bogat

Scanned with OKEN Scanner

în lipide şi de obezitatea avansată; dimpotrivă, au efect inhibant hormonul corticotrop hipofizar, castrarea, estrogenii, tiroxina şi restricţia calorică [996]

Analizele biochimice evidenţiază, în cartilajul articular, o dată cu înaintarea în vîrstă, o scădere a capacităţii de hidratare, o creştere progresivă a cantităţii de colagen şi o scădere a condroitin-sulfaţilor [300]. Studiul hexozaminei în articulaţia genunchiului a permis să se evidenţieze o cantitate medie de 4,5% la nou-născut, de 2,2% între 20 şi 40 de ani şi de numai 1,9%, între 40 şi 90 de ani [601]. Diminuarea hexozaminei este în mare parte influenţată de reducerea, cu vîrsta, a valorilor condroitin-sulfaţilor care constituie 26% din mucopolizaharidele substanţei fundamentale a cartilajului la adult, şi numai 14%, la bătrîn [141].

Colagenul, care reprezintă aproximativ 56,4% din totalul pudrei uscate de cartilaj, creşte progresiv pînă în deceniile 4 — 5, pentru a scădea, apoi, între 60 şi 90 de ani. Pe grupe de vîrstă, s-au găsit următoarele cantităţi: între 10 şi 19 ani, 56,4 $\pm$ 6,0%; între 30 şi 39 de ani, 62,3 $\pm$ 9,0%; între 50 şi 59 de ani, 60,7 $\pm$ 5,8%; între 70 şi 80 de ani, 54,2 $\pm$ 9,7% [27]. De reţinut observaţia că bătrînii cu leziuni osteoartrozice severe pot prezenta şi cantităţi foarte mari (de exemplu 81%) şi cantităţi foarte mici (de exemplu 43%) de colagen, sugerînd caracterul variat al modificărilor cartilajului. La acelaşi grup de vîrstă nu s-au constatat diferenţe, statistic semnificative, între cantitatea de colagen din zonele afectate şi cea din zonele învecinate, ceea ce ar constitui un argument în plus pentru rolul îmbătrînirii, în alterarea organizării macromoleculare a cartilajelor articulare. În acelaşi sens pledează şi lipsa diferenţelor între variate articulaţii, la acelaşi individ (coxofemorală, genunchi, tibiotarsiană).

Constatarea acestor modificări, de vîrstă, în organizarea macromoleculară a cartilajelor articulare au impus un studiu amănunţit al celulelor care sintetizează macromoleculele de colagen şi de mucopolizaharide, întrucît diminuarea cantităţilor de substanţă fundamentală şi de fibre ar putea rezulta atît dintr-un deficit de sinteză, cît şi dintr-un exces de degradare. Administrarea de sulf radioactiv, ca test al elaborării de mucopolizaharide acide sulfatate, a permis să se constate că sinteza este exagerată la pacienţii cu osteoartroze [229]. S-a interpretat această creştere a sintezei ca o reacţie de compensare faţă de degradarea nefiziologică a matricei cartilajului articular, reacţie ce nu reuşeşte însă să suplinească depleţia matricei. La aceasta ar contribui un factor de degradare, care hidrolizează macromoleculele de mucopolizaharide acide şi de colagen într-un ritm mai rapid decît le poate înlocui condrocitul. S-a sugerat că ar fi vorba de fermenţi de tipul hialuronidazei, fără să se poată aduce dovezi convingătoare în acest sens. Ulterior, cercetările au fost centrate asupra lizozomilor celulelor din cartilaj, plecîndu-se de la constatarea că lizozomii conţin proteaze, care ar putea degrada fracţia proteică a mucoproteinei din substanţa fundamentală, liberînd, astfel, condroitin-sulfaţii, care trec în circulaţia generală. Investigaţii experimentale tind să demonstreze că eliberarea enzimelor din lizozomi ar apare în spe-

Scanned with OKEN Scanner

cial cînd crește tensiunea locală a oxigenului, efectul cel mai net fiind obținut cu o concentrație de 85% [1008]. Pe secțiuni, un astfel de efect este urmat de reducerea considerabilă a materialului metacromatic din cartilaj, asociat cu prezența, în spațiile intercelulare, de proteaze și de fosfataze acide. Întrucît cartilajul articular este o formațiune avasculară și își satisface nevoile energetice mai mult prin glicoliză anaerobă decît prin procese oxidative, se poate sugera că celulele acestui cartilaj, funcționînd la un consum foarte redus de oxigen, au o susceptibilitate particulară la creșterea locală a acestui gaz. De aceea, orice factor care determină o înmulțire a capilarelor, creînd condiții de hiperoxie prin mărirea aportului de oxigen, favorizează degradarea matricei cartilajului, ca urmare a liberării de enzime lizozomiale [1008]. Rezultă depleția matricei, reflectată pe plan histochimic prin scăderea metacromaziei, pe plan biochimic prin reducerea cantității de condroitin-sulfați și, pe plan radio-, biologic, prin mărirea acumulării de sulf radioactiv în condrocite. Astfel la un pacient de 61 de ani, cartilajul articular de la articulația afectată conținea 0,42% condroitin-sulfați, iar de la articulația neafectată, 1,12%. În schimb, încorporarea de radiosulfat a apărut de peste 30 de ori mai mare în articulația afectată, în comparație cu cea neafectată [143]. Histoautoradiografic se poate constata cum radioizotopul este reținut în special de către condrocitele ce mărginesc zonele de cartilaj lizate. Se pare însă că, în condițiile unei suprasolicitări funcționale și îmbătrînirii organismului, aceste condrocite nu mai elaborează același tip de condromucoproteină ca la adult, ci un complex macromolecular conținînd un condroitin-sulfat cu lanțuri mai scurte și cu greutate moleculară mai redusă, ceea ce ar putea explica și diminuarea cantității de apă reținută în substanța fundamentală a cartilajelor afectate, precum și stabilitatea structurală, mai redusă, a acestui mucopolizaharid, la extracții enzimatice și chimice. Așa cum am mai menționat, aceste alterări legate de vîrsta înaintată nu au putut fi corelate și cu efectele cumulative ale microtraumatismelor, apărînd frecvent, de exemplu, modificări degenerative în zona mediană a capului femural, care nu suportă direct presiunile mecanice [464].

La nivelul cartilajelor hialine, de tipul celui costal și bronșic, modificările de vîrstă sînt, de asemenea, foarte evidente. Se constată o tumefiere a condroblaștilor, alternînd cu procese degenerative celulare, depuneri de săruri de calciu, acumulări de pigment, fragmentări ale fibrelor. Din punct de vedere biochimic, modificarea cea mai caracteristică pare a fi inversarea raportului condroitin sulfați/kerotosulfat. La embrion și la făt keratosulfatul lipsește, iar condroitin-sulfații au un grad redus de sulfatare. După naștere cresc atît condroitin-sulfatul A, cît și cel C, dar această creștere nu este paralelă, așa cum rezultă din studiul raportului lor. El este de 0,7 după naștere, apoi ajunge 1,0 și diminuă pînă la 0,25 la adult datorită scăderii cantitative a condroitin-sulfatului A [716]. De la această perioadă, cu vîrsta, începe creșterea liniară a keratosulfatului [553], de la 9% la adult, la 29% la bătrîn. Această creștere se reflectă și în evoluția raportului galactozamină/glucozamină, care, în cartilajul bronhic, este de 0,83 în

Scanned with OKEN Scanner

deceniul al 4-lea, şi de 0,59 în deceniul al 8-lea [931]. O evoluţie asemănătoare a fost menţionată şi în alte cartilaje hialine, deşi există variaţii topografice destul de nete. Astfel de exemplu, modificările de vîrstă în paternul mucopolizaharidelor apar mai nete în cartilajele cricoid, tiroid şi traheal, în comparaţie cu cel costal, şi mai nete în cel costal, în comparaţie cu cel articular.

Modificările de vîrstă ale cartilajului hialin, evidenţiate prin metode biochimice, sînt reflectate şi de alterările paternului histochimic. La nivelul cartilajului costal, de exemplu, coloraţia cu albastru alcian în clorură de magneziu 0,9 *M* semnalează o reactivitate histochimică din ce în ce mai pronunţată, cu cît organismul este mai bătrîn; acest substrat reactiv este considerat a fi reprezentat de keratosulfat [1037]. Dar, în plus faţă de datele de biochimie, care au demonstrat creşterea progresivă a keratosulfatului cu înaintarea în vîrstă, studiile histochimice au atras atenţia că acest mucopolizaharid se acumulează în special în matricea interteritorială a cartilajului, respectiv în regiuni situate între zonele de substanţă fundamentală din jurul fiecărui condrocit. Nu s-au putut constata aspecte de eliminare a keratosulfatului de la celulă pînă la locul de acumulare, mecanismul depozitării rămînînd încă neexplicat. Turnoverul său extrem de lent, în comparaţie cu al condroitin-sulfatului, aproape de inerţia metabolică, îi permite să difuzeze departe de celule şi să se acumuleze în zonele cele mai deficitare din punctul de vedere al nutriţiei. Astfel, se impune cu uşurinţă ideia că vom întîlni condroitin-sulfaţii în jurul celulelor în zonele de regenerare, respectiv peste tot unde cartilajul rămîne încă tînăr, bogat în celule şi cu o nutriţie adecvată; dimpotrivă, keratosulfatul va fi prezent acolo unde cartilajul îmbătrîneşte, unde celulele au dispărut şi nutriţia a devenit deficitară. Prezenţa condroitin-sulfatului în concentraţie mare în cartilajul tînăr duce la formarea de soluţii vîscoase, care constituie o barieră în calea pătrunderii altor macromolecule şi a anionilor. De asemenea, ele nu permit formarea unui mare număr de fibrile colagene. Dimpotrivă, prezenţa keratosulfatului nu împiedică acumularea de macromolecule străine, iar fibrilogeneza apare intensă în matricea interteritorială, bogată în acest mucopolizaharid.

Dacă există cantităţi suficiente de condroitin-sulfaţi, soluţiile vîscoase pe care le formează au un anumit grad de hidrofilie şi pot absorbi apa din zona interteritorială, unde se găseşte acumulată între fibrele de colagen. Deplasarea apei din zonele pericelulare, bogate în condroitin-sulfaţi, spre matricea interteritorială, bogată în fibre colagene şi în sens invers, contribuie la adaptarea mecanică a cartilajului în cursul variaţiilor ciclice de presiune şi tracţiune, determinate de mişcările respiratorii. Înlocuirea progresivă a condroitin-sulfaţilor prin keratosulfat, alterează acest tip de funcţionare după modelul unui *telescopic shock absorber*, întrucît capacitatea keratosulfatului de a lega apa este extrem de redusă. Ar exista, deci, un raport invers între acumularea acestui mucopolizaharid şi posibilitatea cartilajului de a funcţiona pe baza volumului exclus [1037]. Datele prezentate, deşi nu au decît valoarea unei ipoteze, pot ajuta la o mai adîncă

Scanned with OKEN Scanner

înțelegere a mecanismului de îmbătrînire a cartilajelor hialine și articulare.

O altă problemă importantă, legată de modificările de vîrstă, este aceea a calcificării anormale, în special a cartilajului costal.Mineralizarea s-ar datora diminuării unei fracții mucoproteice, denumită P-PL 5, care devine deficitară pe măsură ce organismul îmbătrînește și care, *in vitro*, împiedică depunerea de săruri de calciu în cartilaj [822]. Această proteinpolizaharidă se găsește în cantitate de 0, 107 g pe g de substanță uscată și poate preveni depunerea a 0, 070 g de fosfat de calciu [278]. Diminuarea ei s-ar produce după vîrsta de 30 de ani, cînd începe mineralizarea cartilajului costal.

O altă problemă se referă la transformările ce au loc în discul intervertebral, atît în nucleul pulpos, cît și în inelul fibros. Deși structural nu se poate vorbi de aspecte histologice similare, alterările organizării macromoleculare sînt foarte apropiate. În consecință, se constată o reducere a condroitin-sulfaților și, în plus, și a acidului hialuronic, asociată cu o creștere progresivă a keratosulfatului. Acest ultim proces este chiar mai intens decît în cartilaj, keratosulfatul reprezentînd aproximativ 10 % din totalul mucopolizaharidelor în primul deceniu al vieții și peste 50 %, în deceniul al 8-lea. Drept urmare, cu vîrsta, crește și raportul glucozamină/galactozamină, de la 0,5 la 15 ani, la 1,5 la 90 de ani, reflectînd aceiași mărire a cantității de keratosulfat [449]. Tot cu înaintarea în vîrstă se modifică și raportul condroitin-sulfat A/C, de la 2/1 la 1/2, datorită diminuării mai importante a cantității de condroitin-sulfat. A. Reducerea, la bătrîni, a cantității totale de mucopolizaharide din nucleul pulpos și modificarea calitativă cu diminuarea considerabilă a substanțelor hidrofile, este urmată de o deshidratare a discului intervertebral, cu alterarea elasticității și favorizarea prolapsului. La aceste modificări se mai adaugă o scădere a gradului de polimerizare și o labilizare a legăturilor dintre mucopolizaharide și proteine [748]. Labilizarea legăturilor face să rămînă neconectate în complexe macromoleculare proteinele necolagene, ceea ce duce la o alterare și mai pronunțată a proprietăților viscoelastice ale discului. De remarcat că eliberarea de proteine necolagene din legăturile lor cu mucopolizaharidele, o dată cu înaintarea în vîrstă, apare mult mai evidentă în nucleul pulpos, decît în cartilaj [271]. Reducerea cantității de mucopolizaharide de tipul acidului hialuronic și condroitin-sulfaților, creșterea keratosulfatului, diminuarea cantității de apă și acumularea de proteine necolagene modifică profund organizarea macromoleculară a nucleului pulpos la bătrîni, aceasta reflectîndu-se și în aspectul macroscopic : din necolorat și turgescent, așa cum este la tineri, devine parțial degradat și colorat maroniu, la bătrîni. În inelul fibros, celulele cu aspect de condrocite degenerază între vîrsta de 1 și 8 ani, dispărînd total la sfîrșitul primului deceniu al vieții. În același timp, substanța fundamentală de tip mucoid este treptat înlocuită de un fibrocartilaj, care se transformă în inelul fibros. Procesul acesta de maturare structurală durează, la om, pînă în al 2-lea deceniu, apoi încep modificările degenerative de vîrstă, anunțate de necroze celulare, zone de edem, hialinizări de fibre.

Scanned with OKEN Scanner

Către al 4-lea deceniu apar şi invazii de muguri vasculari, iar procesele degenerative şi de eroziune se accentuează. Ca şi la nivelul nucleului pulpos, se constată o scădere a cantităţii totale de mucopolizaharide acide, o modificare a raportului glucozamină/galactozamină determinat de creşterea keratosulfatului şi scăderea condroitin-sulfaţilor, deshidratare, înmulţirea legăturilor intermoleculare dintre fibrele de colagen, cu creşterea rezistenţei lor mecanice şi scăderea capacităţii de adaptare la modificările locale de mediu.

Este interesant de semnalat că, în herniile de disc, apar aceleaşi modificări ca cele determinate de procesul de îmbătrînire, dar mai rapid şi cu o intensitate mai mare [1020], [1021].

OS

Cu înaintarea în vîrstă, la nivelul osului se produce o reducere progresivă a capacităţii de remodelare, în raport cu microtraumatismele incluse în procesul natural al evoluţiei ontogenetice. Pe plan clinic şi radiologic, apare o scădere de volum al oaselor scheletului, sub o limită arbitrar admisă, denumită osteoporoză senilă şi caracterizată printr-o balanţă negativă între procesele de neoformare şi degradare, ducînd la un exces de rezorbţie în remodelarea endostală. Această balanţă negativă s-ar schiţa de la vîrsta de 20—25 ani, accentuîndu-se progresiv spre bătrîneţe [351]. Ea este considerată consecinţa unei diminuări a sintezei de matrice osoasă, asociată cu o accentuare a degradării fiziologice a osului şi nu pare a reflecta o alterare metabolică particulară. De aceea, la baza osteoporozei senile ar sta o dereglare între rezorbţia osului vechi şi formarea osului nou, a cărei intensitate mică explică absenţa eliminării crescute de hidroxiprolină în urină [766]. Reamintim că, în cazurile cînd hidroliza matricei osoase este masivă (ca în boala Paget, hiperparatiroidismul primar, tumorile cu metastaze osoase, acromegalie, osteomalacie etc.) apare o importantă cantitate de hidroxiprolină în urină.

În condiţii fiziologice, ar exista două tipuri principale de remodelare a osului : internă şi externă. Cea internă înglobează procesele de degradare şi neoformare care au loc în spaţiul dintre periost şi endost, respectiv în interiorul corticalei şi al trabeculilor mari. Alterarea ei în cursul senescenţei duce, în primul rînd, la diminuarea proprietăţilor de rezistenţă mecanică a osului. Remodelarea externă sau superficială este limitată la periost şi endost, influenţînd atît creşterea, cît şi volumul oaselor. De aceea, ea reprezintă un mecanism important de producere a osteoporozei senile, caracterizată tocmai prin reducerea de volum al fiecărui os în parte. Se sugerează că, în cursul evoluţiei ontogenetice, cele două tipuri de remodelare ar fi diferit influenţate ca ritm şi intensitate, ceea ce ar putea reflecta existenţa unor mecanisme diferite de reglare [351].

Factorii care determină apariţia osteoporozei senile şi modul cum modifică organizarea macromoleculară a osului, reprezintă subiectul a

Scanned with OKEN Scanner

numeroase speculații și discuții. În primul rînd, nu s-a putut preciza dacă osul poate să-și piardă fracția minerală, fără să se degradeze, concomitent, și matricea de care este legată. În transplante, unde posibilitatea unei osteogeneze este exclusă, se produce mai întîi dispariția calciului, iar matricea persistă timp îndelungat, fără să mai aibă capacitatea de recalcificare. În tumorile oaselor ar exista stadii inițiale de demineralizare, urmate însă, rapid, și de distrugerea matricei. În osteomalacie, fibrele de colagen din matricea decalcificată persistă vreme îndelungată, afecțiunea fiind caracterizată tocmai prin acest exces de matrice decalcificată. În osteoporoze, succesiunea alterărilor pare mai puțin clară. În anumite zone decalcificate, matricea persistă și își păstrează capacitatea de remineralizare ; în altele, pare să sufere o degradare, concomitentă cu demineralizarea.

Factorii locali care determină degradarea ce duce la osteoporoză par mult mai variați decît se credea cu un deceniu în urmă. Importanța aproape exclusivă acordată, în trecut, celulei pe care o denumim osteoclast, nu mai este confirmată de studiile recente. Aspectul de macrofag și prezența sa în zonele de osteoliză sugerează o participare directă la procese de resorbție ce a fost confirmată și de observațiile de microscopie electronică, care au atras atenția asupra existenței a numeroase prelungiri protoplasmatice, membraniforme ce vin în contact cu zona de rezorbție osoasă. La periferia lor apar excrescențe digitiforme, ca o margine în perie. Prelungirile membranoase ale osteoclaștilor nu conțin mitocondrii sau alte organite celulare, ci numai produși variați de fagocitoză. Reticulul endoplasmic al osteoclaștilor este foarte redus în comparație cu cel al osteoblastului, surprinzînd, în schimb, marea bogăție de mitocondrii. După cum am mai menționat, în citoplasma acestor elemente se găsesc numeroși produși de fagocitoză, incluzînd cristale de calciu, fragmente de fibre colagene,mase amorfe și substanțe de natură variată, conținute în vacuole. Marginea în perie a expansiunilor citoplasmatice este considerată ca o structură adaptată rezobției osului, iar produșii fagocitați ar reflecta degradarea concomitentă a fracției minerale și organice, cu înglobarea intracitoplasmatică a complexelor macromoleculare degradate. Astfel, microscopia electronică a confirmat că osteoclastul este un element specializat în rezorbția produșilor de degradare rezultați din osteoliză, dar nu a adus nici o dovadă că acestă celulă ar juca un rol important în determinarea procesului de osteoliză. Marele număr de mitocondrii prezent în protoplasma lor sugerează o mare cheltuială de energie, iar reticulul endoplasmic foarte puțin dezvoltat sugerează o capacitate de sinteză extrem de redusă. Această mare cheltuială de energie ar putea fi corelată cu digestia produșilor fagocitați. Ar mai fi de menționat o observație care datează de aproape un secol, atestînd că numărul de osteoclaști crește proporțional cu bogăția rețelei capilare ; cercetări recente au confirmat-o, demonstrînd că, la o tensiune a oxigenului de 10—20%, sinteza osului depășește degradarea, la 30 % ambele procese se intensifică, la 50 % se egalizează, iar, după 50 %, crește numai susceptibilitatea la degradare [1034]. Un alt rezultat interesant, legat de studiile asupra semnificației funcționale a osteoclaștilor, este observația că, dacă se tratează

colagenul cu dinitrobezen, apar în implantele de ţesut osos numeroase celule de tipul osteoclaştilor. Această apariţie nu este condiţionată de procesul de rezorbţie osoasă, ci de prezenţa unui inel benzenic care conţine grupări nitro, situate în poziţie para. Dacă aceleaşi grupe sînt situate în poziţie orto, nu induc dezvoltarea osteoclaştilor. În lumina acestor date, geneza osteoclaştilor parea fi dependentă de anumite transformări chimice care au loc la nivelul focarului de osteoliză, apărînd, deci, ca un proces secundar rezorbţiei osului [525]. Nu avem, astfel, la ora actuală o fundamentare ştiinţifică spre a susţine că osteoporoza senilă ar rezulta dintr-o activare a transformării osteoblaştilor în osteoclaşti, aşa cum s-a crezut pînă acum. Pare foarte probabil că osteoclaştii nu sînt decît macrofage adaptate procesului de rezorbţie osoasă, a căror activitate începe după ce, prin alte mecanisme, s-a produs osteoliza.

Cercetări recente aduc tot mai multe argumente în sprijinul ipotezei că osteoliza este determinată de o eliberare de hidrolaze acide din lizozomii osteoblaştilor şi ai osteocitelor. Acest proces s-ar asocia sau ar fi precedat de o modificare metabolică, din care rezultă acumulări locale de acizi citric şi lactic. Prin reducerea pH-ului, aceşti acizi favorizează atît eliminarea cristalelor de hidroxiapatită, cît şi acţiunea hidrolazelor acide asupra matricei demineralizată.

S-a sugerat că, sub influenţa fie a unor cantităţi mărite de hormon paratiroidian, fie a altor factori încă necunoscuţi care acţionează mai intens o dată cu înaintarea în vîrstă se produce, în osteoblast, o blocare a activităţii dehidrogenazei cetoglutarice, ciclul Krebs desfăşurîndu-se doar de la malat, la glutamat. În acest fel, se favorizează sinteza unor aminoacizi de tipul prolinei şi hidroxiprolinei şi, inclusiv, a unei matrice osoase ce conţine o mare cantitate de fibre colagene. În alte celule s-ar produce o blocare a activităţii dehidrogenazei izocitrice; drept urmare, alfa-ceto-glutaratul, în loc să se transforme în L-glutamat, se transformă în succinat. La acest proces s-ar asocia şi dezintegrarea prolinei şi hidroxiprolinei în L-glutamat. Ambele alterări metabolice favorizează apariţia unei cantităţi, anormal de mari, de L-izocitrat, punct la care ar fi blocat ciclul Krebs, prin lipsa enzimei adecvate. Se creiază, astfel, atît condiţiile solubilizării componentei minerale, cît şi ale măririi susceptibilităţii matricei la factorii de degradare [1160]. Desigur că toate aceste date sînt doar ipotetice, ca şi afirmaţiile că moleculele organice, rezultînd din degradarea matricei, ar putea acţiona ca agenţi chelatori, captînd calciul şi extinzînd astfel zona de demineralizare [723].

Un interes mai deosebit l-au trezit lucrările care au demonstrat că, incubarea colagenului din os cu un omogenat de osteoblaşti, permite evidenţierea unei activităţi colagenolitice [1195]. Colagenul extras din os, marcat cu radioizotopi (şi care a rezistat la acţiunea unor proteze nespecifice de tipul tripsinei sau pepsinei) a fost degradat în unităţi dializabile de către enzime existente în fracţii obţinute prin ultracentrifugarea osteoblaştilor. S-a constatat că agenţii care în general labilizează membranele lizozomiale produc, şi la nivelul osului, o eliminare extracelulară de fosfataze acide şi de variate alte tipuri de hidrolaze. Printre aceste hidrolaze s-a identificat un ferment a cărui activitate dependentă de temperatura mediului ambiant, termolabilitate, specificitate sterică faţă de substrat,

Scanned with OKEN Scanner

ca și necesitatea prezenței unui cation divalent pentru a apare hidroliza maximă, îi conferă particularități similare cu cele ale colagenazei bacteriene. Pe baza acestor rezultate s-a emis ipoteza că mecanismul fundamental al rezorbției osului ar fi eliberarea de enzime lizozomiale cu activitate colagenolitică [1198]. În lumina acestor date, se poate explica de ce rezorbția osului în culturi de țesuturi este constant însoțită de degradarea fibrelor de colagen, pînă la unități de tipul celor rezultate din digestia cu colagenază bacteriană [1033]. Activitatea enzimei colagenolitice din lizozomii ostoblaștilor pare, *in vitro*, net potențată de hormonul paratiroidian [1161]. În afara enzimei cu proprietăți de colagenază, s-au mai evidențiat, în lizozomii celulelor din oase: beta-glucuronidaze, beta-N.-acetilaminodezoxiglucozidaze, dezoxiribonucleaze acide, ribonucleaze acide, beta-glicerofosfatază acidă și fenilfosfatază acidă (toate avînd un pH optim în jur de 5,0), precum și catepsine, beta-galactozidaze și hialuronidaze, avînd un pH optim în jur de 3,6 [1084]. Se sugerează că toate aceste enzime lizozomiale ar fi eliminate în bloc, rezultînd procese glicolitice, proteolitice și colagenolitice care lărgesc progresiv spațiul ocupat de osteoblast în masa osului. Dacă această activitate erozivă este potențată prin administrare de hormon paratiroidian, lacunele ocupate de celule devin extrem de largi, fuzionează și apar zone de osteoliză cu diametre variabile. Se sugerează, de asemenea, că osteoblastul, prin eliberare de ioni de hidrogen, poate modifica pH-ul local, influențînd ciclic activitatea variatelor tipuri de enzime. Astfel, catepsinele par inactive asupra matricei osoase la un pH fiziologic, dar, dacă pH-ul este coborît pînă la 3,0, aceleași enzime încep să atace fibrele de colagen, distrugînd cristalinitatea macromoleculelor și creind condițiile transformării colagenului într-o substanță amorfă de tipul gelatinei, degradată, în continuare, de proteaze nespecifice. Aceasta ar fi doar unul dintre mecanismele prin care sînt degradate fibrele de colagen, cel de al doilea fiind bazat pe efectele unei adevătate colagenaze, care, fără a fi constant prezentă în lizozomi, este în mod cert elaborată de celule, în anumite condiții de stimulare metabolică [747]. În lumina acestor date, toți factorii care labilizează membranele lizozomiale, măresc ritmul de degradare a osului, un exemplu demonstrativ din acest punct de vedere constituindu-l osteoporoza care apare în urma tratamentelor prelungite cu heparină [560]. Efectele similare constatate după administrarea de vitamină A, saponină etc.[37],[391], sugerează multiplicitatea agenților care, prin intermediul aceluiași mecanism, potențează degradarea osului, creind balanță negativă între ritmul de osteogeneză și cel de osteoliză. Toți acești agenți pot contribui, în timp, la apariția osteoporozelor senile.

Labilizarea lizozomilor se asociază cu modificări metabolice, favorizînd acumularea de acizi organici, iar produșii de degradare stimulează apariția celulelor de tip osteoclastic, dotate cu funcții fagocitare, care „curăță" focarul osteolitic, înglobînd produșii rezultați atît din dizolvarea cristalelor, cît și din hidroliza enzimatică a matricei. O altă parte a acestor produși, ajunși la forme dializabile, trec în circulația generală.

În legătură cu același subiect, menționăm rezultatele unor cercetări personale efectuate pe matricea demineralizată a scăriței urechii medii.

Scanned with OKEN Scanner

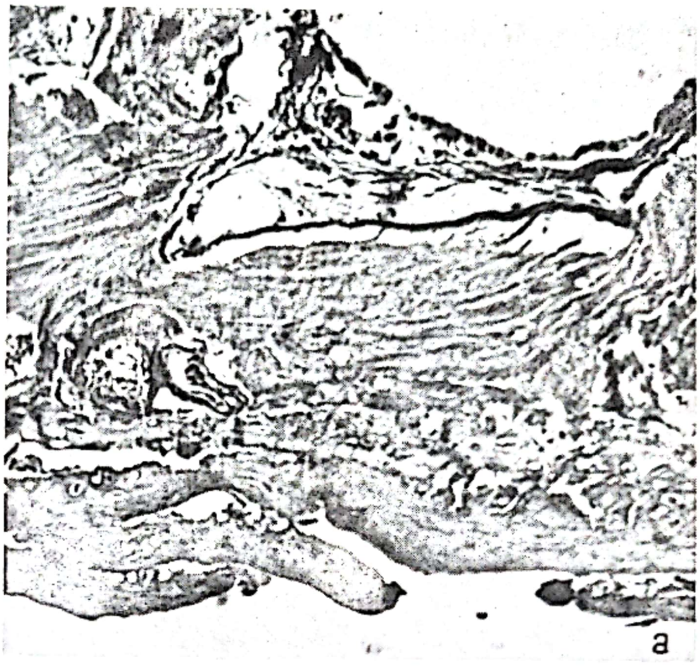


Fig. 50. Platina scăriței de adult. Decalcificare prin electroliză. a) Materialul fucsinofilic rezistă la digestia cu colagenază. b) Materialul fucsinofilic este total digerat cu colagenază, dacă a fost, în prealabil, incubat cu sialidază (VELICAN C.[1107]).

Scanned with OKEN Scanner

După 12 ore de digestie cu colagenază, materialul fucsinofilic al matricei osoase nu a fost modificat; dacă, însă, în prealabil, am eliminat acidul sialic prin digestie cu sialidază sau prin hidroliză acidă, apare o susceptibilitate extrem de mare a fibrelor de colagen la aceiaşi incubaţie cu colagenază, ducînd (*fig. 50*) la degradarea completă a matricei [1122], [1123]. Aceste observaţii sugerează că acidul sialic acţionează ca un factor de protecţie sterică a fibrelor de colagen din matricea osoasă investigată, faţă de efectele degradante ale colagenazei; ele aduc aspecte noi privind complexitatea mecanismelor care asigură ritmul adecvat de degradare a osului. Corelăm aceste rezultate cu constatările efectuate pe baza unor analize biochimice, din care reiese că tripsina nu poate ataca decît cel mult 1/3 din legăturile unor complexe glicoproteice ale mucinei salivare, datorită prezenţei, la suprafaţa macromoleculelor, a grupelor carboxil ale acidului sialic, ce exercită o importantă protecţie sterică [402].

În afara acestor rezultate, legate de degradarea fibrelor de colagen, trebuiesc luate în consideraţie şi datele privind modificările, de vîrstă, ale mucopolizaharidelor conţinute în matricea osoasă. O dată cu dezvoltarea osteoporozei senile, s-a notat o scădere a raportului glucozamină/galactozamină, scădere ce nu există la bătrînii de vîrstă similară, dar fără osteoporoză. Administrarea de steroizi anabolizanţi la osteoporotici ar fi urmată de normalizarea raportului dereglat. Aceste rezultate ar sugera ipoteza că hormonii steroizi ai glandelor genitale ar întreţine un anumit ritm de sinteză a osului după terminarea perioadei de creştere, iar scăderea lor după menopauză ar constitui un factor de inhibare a capacităţii osteoblaştilor de a sintetiza matricea, în ritmul în care este degradată. Această ipoteză, uşor de admis, nu este suficient susţinută de datele clinice, întrucît terapia cu hormoni anabolizanţi nu reface volumul iniţial al oaselor micşorate prin procesul de osteoporoză, iar recalcificarea este, de multe ori, extrem de discutabilă. În acelaşi sens pledează şi anumite analize biochimice, care nu au putut evidenţia, în osul cu osteoporoză, dereglări ale organizării macromoleculare, pe care să le corecteze administrarea anabolicelor [562], [1083]. Totuşi, cu toată abundenţa de date care arată că raportul între componenta minerală şi organică nu ar fi modificat o dată cu apariţia osteoporozei şi că densitatea şi elasticitatea osului ar fi păstrate, nu se poate trece cu vederea că, faţă de acelaşi tip de traumatisme, numărul de fracturi se dublează începînd din al 5-lea deceniu al vieţii [83,142]. Însăşi faptul că alterările de vîrstă apar atît în metafiza, cît şi în diafiza oaselor lungi, sugerează că osul în întregime prezintă o modificare a rezistenţei la presiune.

Un alt aspect care merită să fie discutat se referă la variaţiile leziunilor osteoporotice în funcţie de sex, scăderea densităţii radiologice a osului crestei iliace şi a corpilor vertebrali apărînd mai timpuriu la femeie, decît la bărbatul de aceeaşi vîrstă[1153]. Intervin hotărîtor în acest sens şi alţi factori încă neprecizaţi, cum rezultă, de exemplu, din constatarea că incidenţa osteoporozei senile şi de menopauză este mult mai rară la negrese, în comparaţie cu femeile albe de aceiaşi vîrstă [142]. De aceea, orice tratare unilaterală a acestei probleme complexe, cu limitarea ei la acţiunea unui

Scanned with OKEN Scanner

singur factor, pare necorespunzătoare realității. De aceea, și tratamentele propuse, deși par logice în lumina simplității mecanismului patogenic prezentat, sînt explicabil ineficiente, dacă le confruntăm cu complexitatea procesului biologic care stă la baza apariției osteoporozei senile.

PIELE

Modificările de vîrstă în organizarea macromoleculară a țesutului conjunctiv din piele reprezintă, de veacuri, semnul cel mai obiectiv al îmbătrînirii organismului. Aceste modificări se caracterizează prin cutarea, subțierea și pierderea elasticității pielii, rezultînd o creștere a vulnerabilității față de variați factori mecanici.

Anumiți autori susțin că modificările de vîrstă în organizarea macromoleculară a dermului ar constitui un test general valabil de senescență a întregului organism. Intervin însă mulți factori de eroare în determinarea acestui test, cum ar fi organizarea neomogenă și neorientată a fibrelor de colagen din variate zone ale dermului, existența de variații cantitative ale diverselor tipuri de macromolecule de la o regiune a pielii la alta, influențele unor factori locali epidermici sau ai glandelor anexe etc. Această organizare macromoleculară neomogenă reflectă variabilitatea micro sau macrotraumatismelor la care este supusă fiecare zonă de piele în cursul vieții, variabilitatea expunerii la raze solare, inclusiv la cele ultraviolete și așa mai departe. Tot în determinarea heterogeneității macromoleculare intervine prezența sau absența țesutului adipos hipodermic și abundența locală a vascularizației. De aceea, ne vom feri în cursul expunerii să prezentăm un tablou general asupra mecanismelor de „îmbătrînire" a pielii, limitîndu-ne la analiza modificărilor diferitelor componente constitutive, în cursul evoluției ontogenetice a organismului.

Colagenul și elastina

Date experimentale menționează o creștere, progresivă cu vîrsta, a cantității de colagen, care reprezintă 12,9% la șobolanul de 4 săptămîni și 22,5 %, la cel de 8 luni [547]. Aceste rezultate sînt greu de extrapolat la om, întrucît șobolanul trăiește doar trei ani, avînd un alt ritm de remodelare a țesutului conjunctiv. De aceea, nu pare surprinzător faptul că, deși creșterea cu vîrsta a colagenului din piele a fost evidențiată și la om, după 70 de ani se produce o diminuare netă, determinînd apariția pielii subțiri și cutate, particulare bătrînilor. Diminuarea colagenului din piele pare mai netă la femei, în comparație cu bărbații de aceeași vîrstă [993].

Cu peste trei decenii în urmă s-a menționat că, o dată cu îmbătrînirea, colagenul din piele devine progresiv mai greu solubil [781]. Aceste date au fost confirmate prin variate metode de investigație, inclusiv marcarea

fracţiilor colagenului cu radioizotopi. La adult, de exemplu, s-au putut individualiza : o fracţie solubilă în soluţia 0,15 *M* de clorură de sodiu, cu timp de înjumătăţire de 12 ore ; o fracţie solubilă în 0,5 *M* clorură de sodiu, cu timp de înjumătăţire de 20 de ore ; fracţii insolubile cu timpi de înjumătăţire de mai mulţi ani, sau total nelabile metabolic. Fracţiile cu turnover rapid trec treptat în forma insolubilă de agregare macromoleculară, proces în timpul căruia se pierde în medie aproximativ 35 % din totalul cantităţii de colagen, recent sintetizat [799].

Ca urmare a trecerii în forma insolubilă, trecere ce se accentuează progresiv cu înaintarea în vîrstă, fracţia insolubilă a colagenului (exprimată în mg/100 mg piele uscată şi delipidizată) creşte de la 44,1 la copilul prematur, la 63,7 la nou-născut şi la 75,1 la adult [1011]. În aceeaşi perioadă, fracţia solubilă scade de la 20,4 mg/100 mg piele uscată la prematur, la 8,6 la nou născut şi la numai 3,1 la adult. Ar mai fi de menţionat că, în aceleaşi lucrări, s-a constatat că raportul prolină/hidroxiprolină este de 1,8 în colagenul insolubil al copiilor prematuri, 2,1 la nou-născuţi şi 2,2 la adulţi, sugerînd şi anumite modificări calitative în paternul aminoacizilor. În sprijinul aceleiaşi ipoteze pledează şi observaţii experimentale, indicînd raportul prolină/hidroxiprolină din fracţia neutrosolubilă : 1,08 la şobolanul tînăr şi 1,32 la cel bătrîn ; cel din fracţia acidosolubilă : 1,14 la animalul tînăr şi 1,35 la cel bătrîn ; cel din fracţia insolubilă : 1,16 la animalul tînăr şi 1,35 la cel bătrîn [187]. Pe baza acestor analize se poate susţine, de asemenea, o modificare cu vîrsta a raportului aminoacizilor constitutivi ai macromoleculei de colagen.

Un alt aspect al procesului de maturare cu vîrsta, în afara creşterii fracţiei insolubile a colagenului, este reflectat şi de evoluţia raportului cantitativ între monomerii alfa şi dimerii beta. În pielea de nou-născut fibrele de colagen sînt alcătuite din macromolecule în care procesul de maturare se opreşte la nivelul dimerilor care sînt rapid degradaţi în soluţii acide, în timp ce în soluţii neutre se obţin monomerii [51]. O dată cu înaintarea în vîrstă, de-a lungul perioadei de creştere se menţine acelaşi raport între monomeri şi dimeri, sugerînd predominanţa legăturilor intramoleculare în mecanismul de stabilizare a macromoleculelor [49]. Ulterior, în perioada de îmbătrînire, apare procesul de multiplicare a legăturilor intermoleculare, fibrele de colagen din derm fiind mult utilizate pentru testarea densităţii acestor legături, în raport cu diferitele decenii ale vîrstei.

Este interesant de menţionat, ca o particularitate în dezvoltarea pielii, că maturarea colagenului apare în general destul de tîrziu, ceea ce permite o mare adaptabilitate la variate *stress*-uri mecanice, indiferent de direcţia din care se aplică forţa principală. O altă problemă interesantă este semnificaţia fracţiei acidosolubile a colagenului din piele, fracţie avînd un turnover tot atît de redus ca şi cea insolubilă, dar fără tendinţa de precipitare fibrilară. Ea nu ar reprezenta un precursor al unităţilor ce alcătuiesc fibrele adulte, aşa cum este fracţia neutrosolubilă, ci se consideră „în echilibru" cu colagenul insolubil [797]. Semnificaţia biologică a acestui „echilibru" rămîne să fie precizată mai tîrziu.

Ca urmare a creşterii numărului de legături încrucişate intermoleculare, în perioada de trecere de la adult spre bătrîn, colagenul din piele

Scanned with OKEN Scanner

se deshidratează, devine mai rigid şi prezintă o mai mare rezistenţă mecanică. Pe plan macromolecular se poate evidenţia o creştere progresivă a cristalinităţii, o ridicare progresivă a temperaturii de contracţie termică şi o eliminare, tot mai redusă, de hidroxiprolină, în perioada acestei contracţii [1144]. Alte modificări calitative macromoleculare sînt reflectate de reducerea, cu vîrsta, a energiei de activare, necesare precipitării macromoleculelor, pentru a forma fibrile [788].

Zona unde se face trecerea de la fibrele nemature, spre cele progresiv mai mature, este situată sub epiderm. La acest nivel apare turnoverul cel mai activ, iar spre dermul profund scade, pînă la totala inerţie metabolică a fibrelor [467]. Cercetările efectuate de noi [1105] au demonstrat că susceptibilitatea la digestia cu colagenază scade cu cît ne depărtăm de dermul superficial, în direcţia zonei profunde. Analiza materialului supus incubaţiilor cu colagenază ne-a mai permis să constatăm: *a*) existenţa, în dermul superficial, a unor fibre care sînt total degradate; *b*) existenţa, în dermul mijlociu în special, a unor fibre care, sub acţiunea enzimei, pierd materialul fucsinofil, dar devin metacromatice şi PAS-pozitive; *c*) existenţa, în dermul mijlociu şi profund, a unor fibre ce nu îşi modifică paternul histochimic după digestia cu colagenază. Aspecte caracteristice ale acestor observaţii sînt prezentate în *fig. 51*. Aceste date sugerează complexitatea organizării macromoleculare a colagenului din fibre, unele părînd a fi alcătuite doar din macromolecule de colagen slab interconectate, altele dintr-un strat superficial de colagen, avînd în grosimea fibrei complexe mucoprotidice şi glicoprotidice şi altele dintr-un colagen hiperstabilizat prin legături intermoleculare şi care nu este degradat de colagenază. Investigaţiile menţionate se referă la pielea din regiunea gambei şi nu se suprapun întru totul paternului histochimic constatat, la pacienţi de aceeaşi vîrstă, în alte zone topografice. În acelaşi sens pledează şi observaţii atestînd că, o dată cu înaintarea în vîrstă, în pielea de pe braţ se produce o degradare mai evidentă a fibrelor de colagen, decît în cea de la nivelul coapsei [993]. Toate aceste constatări ridică tot atîtea rezerve asupra posibilităţii de a utiliza pielea, în general, ca test al îmbătrînirii organismului.

Problema reducerii, o dată cu senescenţa, a cantităţii de colagen din piele merită să fie mai adînc analizată. Ea este în concordanţă cu observaţiile, deja menţionate la nivelul cartilajelor, oaselor şi al altor organe, unde se constată „fuga" colagenului în ultimele decenii ale vieţii. S-a sugerat ipoteza că, acest proces rezultă din eliberarea enzimelor lizozomiale din fibroblaşti şi că, printre aceste enzime, ar exista fermenţi cu efect colagenolitic [1171], [1196]. În legătură cu acelaşi subiect, subliniem că, în unele boli neuromusculare, incluzînd şi scleroza laterală amiotrofică, pielea, aparent nemodificată, posedă o impresionantă activitate colagenolitică care ar putea rezulta din trei mecanisme ipotetice [361]: *a*) producerea de colagenază sub acţiunea alterărilor determinate de procesul patologic; *b*) existenţa unei activităţi colagenolitice normale a pielii, accentuată numai de condiţiile patologice menţionate; *c*) scăderea sintezei unui inhibitor natural al colagenazei din piele. Pe linia acelorași mecanisme patogenice, menţionăm şi observaţia că, în unele cazuri de sclerodermie,

Scanned with OKEN Scanner

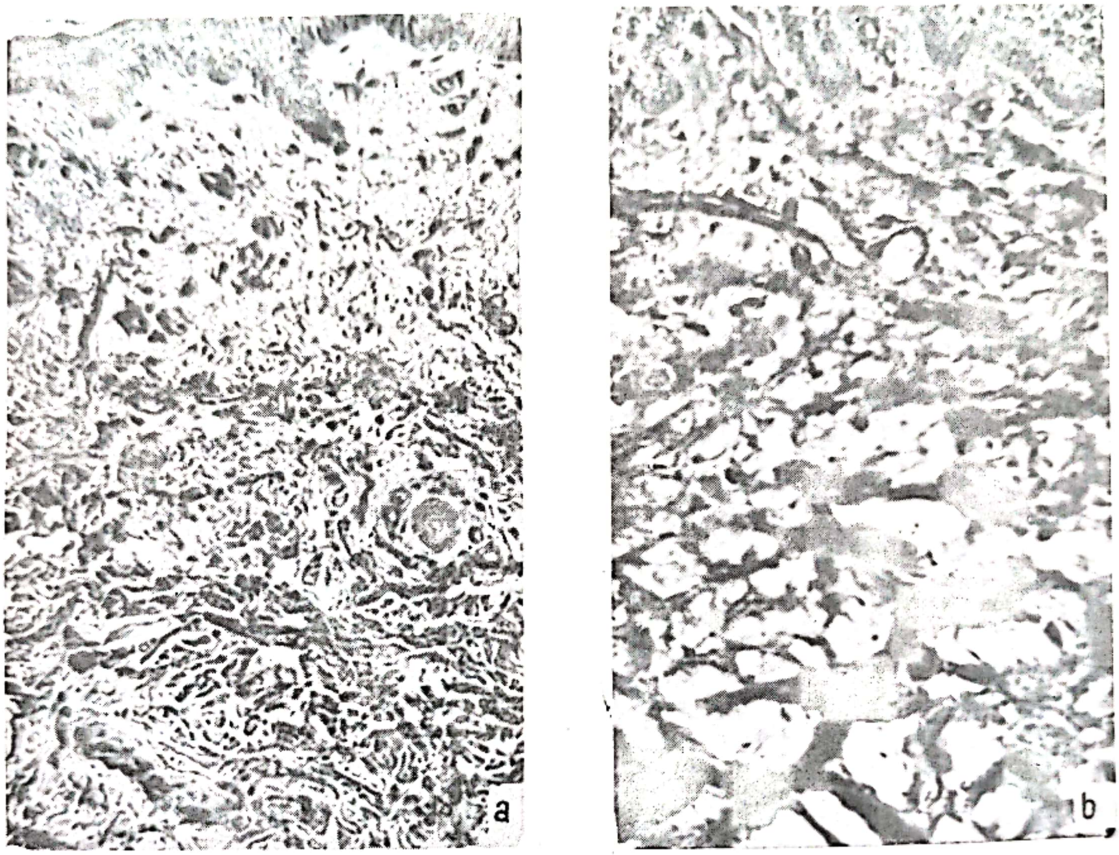


Fig. 51. Piele de adult. a) Evidenţierea fibrelor fucsinofile. b)După tratare cu colagenază o parte din fibre devin metacromatice la albastru de toluidină (× 220).

Scanned with OKEN Scanner

apărute la tineri sau adulţi, s-a putut demonstra o scădere cu aproximativ 50 % a cantităţii de hidroxiprolină din derm, în comparaţie cu pielea normală de la un subiect de vîrstă similară [336]. Pe aceeaşi linie de cercetare, menţionăm că, dintr-un studiu comparativ efectuat pe accidentaţi fără antecedente patologice şi pe bolnavi cronici de vîrste similare, s-a putut constata o scădere cu aproximativ 40 % a colagenului la pacienţii cu boli cronice, deşi macroscopic nu existau modificări patologice ale pielei [50]. Mai mult decît atît, la accidentaţi, raportul monomer alfa/ dimer beta a fost de 1 :1, iar la bolnavii cronici de 2 :1, indicînd o scădere evidentă a gradului de maturare, determinat de prezenţa unor boli cronice. Se acumulează, astfel, tot mai multe date care demonstrează dinamica metabolismului colagenului din piele, în cursul evoluţiei ontogenetice şi influenţa importantă pe care procesele patologice supra-adăugate o exercită asupra acestei dinamici.

Un alt aspect interesant privind influienţa unor factori supra-adăugaţi asupra modificărilor de vîrstă ale colagenului din derm este efectul razelor solare. Pare unanim acceptată constatarea că pielea expusă razelor solare „îmbătrîneşte" mult mai rapid şi mai intens, în comparaţie cu cea neexpusă. La microscopul optic, pielea arsă de soare prezintă o aşa-zisă bazofilie a dermului, asociată cu un anumit grad de atrofie a fibrelor fucsinofile şi cu creşterea numerică a unor structuri colorabile cu orceină sau cu fucselina Weigert. Pe baza acestor constatări, s-a emis ipoteza că, expunerea prelungită la soare din cursul vieţii, ar fi cauza elastozei senile. Dispariţia fibrelor de colagen şi apariţia unui material amorf, cu particularităţile tinctoriale ale elastinei, a fost susţinută şi de anumite observaţii de microscopie electronică [61]. Analize biochimice au afirmat că, în zonele de tegument expuse la soare, cantitatea de elastină este de 8—13 g pe 100 g de piele uscată, în comparaţie cu numai 2,4 g în pielea neexpusă [1010], ceea ce, de asemenea, ar pleda pentru o neoformaţie de fibre elastice. Nu s-au constatat, însă, susceptibilităţi diferite faţă de digestia cu elastază, între cele două zone [728]. Există interpretări diferite în privinţa histogenezei acestui proces, anumiţi autori considerînd că nu este vorba de o neogeneză de ţesut elastic, ci de transformarea fibrelor de colagen alterat, în structuri cu afinităţile tinctoriale şi cu aspectul electronomicroscopic al fibrelor elastice; alţi autori, dimpotrivă, susţin degradarea colagenului şi neoformarea elastinei ca o particularitate morfologică şi chimică a pielei „îmbătrînite" şi expuse, în cursul vieţii, razelor solare. Analize biochimice, utilizînd elastină purificată, material din dermul cu elastoză senilă şi colagen din os, pledează pentru absenţa oricărei similarităţi între paternul acizilor aminaţi ai colagenului, cu acela al structurilor fibrilare din elastoza senilă [1011]. Pe de altă parte, analiza efectelor razelor ultraviolete asupra colagenului din derm a demonstrat fie fisurarea lanţurilor polipeptidice ale macromoleculei (reducîndu-se considerabil stabilitatea structurală a fibrelor), fie, dimpotrivă, înmulţirea legăturilor intermoleculare, cu creşterea stabilităţii structurale. Efectele atît de diferite sînt determinate de doza utilizată şi de intensitatea expunerii, precum şi de starea morfofuncţională şi metabolică a pielii

Scanned with OKEN Scanner

respective. În afara alterărilor stabilității structurale, apar și modificări calitative, caracterizate în special prin diminuarea tirozinei, histidinei și fenilalaninei din macromolecula de colagen [234]. Experimental, razele ultraviolete inhibă și agregarea fibrilară a colagenului în soluție [353]. Se poate deci afirma că există suficiente date care demonstrează o alterare calitativă a colagenului sub influența expunerii la soare, fără să se poată demonstra că macromolecula astfel alterată, ar reprezenta un material cu afinitățile tinctoriale ale elastinei. Cel mai evident pare afectat procesul de maturare a fibrelor, așa cum reiese cu claritate și din următoarele date (valori exprimate în mg/100 g țesut uscat): în pielea neexpusă la soare, 78,2 colagen total, 75, 1 colagen insolubil, 3,1 colagen solubil; în pielea expusă la soare, 45,1 colagen total, 38,7 colagen insolubil și 6,4 colagen solubil. „Fuga" colagenului insolubil, sub acțiunea razelor solare este atît de evidentă încît toate cercetările de morfologie care, de mai multe decenii, susțin reducerea numărului și diametrului fibrelor din dermul zonelor de piele neacoperite, își găsesc o valoroasă confirmare pe plan biochimic. În ceea ce privește fibra elastică, efectul razelor ultraviolete s-ar traduce în special prin inducerea formării unui corp fluorescent, care derivă din tirozină, a cărui prezență mărește susceptibilitatea fibrei la elastază [606].

Datele prezentate, deși foarte incomplete, demonstrează ce adînci transformări apar în organizarea macromoleculară a dermului, la nivelul fibrelor elastice și mai ales colagene, sub acțiunea expunerii la raze solare și, în special, a celor ultraviolete. Aceste date au făcut să se afirme că pielea de adult expusă la soare are un patern biochimic și histochimic asemănător pielii de copil, neexpusă la iradiații [1011]. De aceea, toate aceste efecte particulare trebuiesc luate cu grijă în considerare, cînd se studiază mecanismul „general" de îmbătrînire a pielii, mai ales atunci cînd concluziile sînt folosite ca o bază de înțelegere a senescenței organismului.

Mucopolizaharidele și glicoproteinele

Paternul biochimic al mucopolizaharidelor din piele se schimbă foarte mult, cu înaintarea în vîrstă. În perioada embrionară predomină acidul hialuronic, iar la adult condroitin-sulfatul B. Acest mucopolizaharid este doar în proporție de 5—12 % din totalul mucopolizaharidelor acide la embrion, și de 64% la adult, în timp ce, acidul hialuronic scade de la 78% la embrion, la 30% la adult. Drept urmare, raportul condroitin-sulfat B/acid hialuronic va fi de 0,14 :1 în pielea de embrion, și de 2 :1 în cea de adult. Tot considerabil se reduc și condroitin-sulfatul C, de la 20 % la embrion, la numai 0,1 % la adult [664]. În ceea ce privește hexozamina totală, rezultatele sînt neconcludente, dată fiind marea variabilitate a diferitelor fracții glucidice care conțin această substanță. Este însă important de menționat creșterea, cu vîrsta, a hexozaminelor insolubile, paralel cu a colagenului insolubil, sugerînd că o parte a acestor glucide este inclusă în cimentul interfibrilar. De altfel, substanța fundamentală a pielei con-

Scanned with OKEN Scanner

ţine o cantitate destul de importantă de glicoproteine, bogate în aminoacizi bazici şi cu un procent de 1,9 hexoze, incluzînd glucoză şi galactoză[183]. Analizele biochimice au mai evidenţiat că, atît acidul hialuronic, cît şi condroitin-sulfatul B, nu se găsesc în piele într-un complex macromolecular omogen, ci în variate forme de agregare macromoleculară, care se reflectă şi prin gradul diferit de solubilitate. Cu cît predomină acidul hialuronic, vîscozitatea soluţiilor este mai mare, realizîndu-se o „excludere" a celorlalte macromolecule şi o reducere a permeabilităţii dermului. Această capacitate a soluţiilor de acid hialuronic dispare după administrarea de hialuronidază. Se sugerează că o parte a acidului hialuronic ar forma, cu fibrele de colagen, complexe visco-elastice, mărind puterea de hidratare a fibrelor, lubrefiind suprafeţele de alunecare şi creind condiţii de creştere a rezistenţei mecanice [1071]. Un model de organizare similar a fost sugerat la nivelul peretelui alveolar [323]. Pe măsură ce diminuă cantitatea de acid hialuronic şi creşte cea de condroitin-sulfat B, fibrele de colagen devin mai rigide, se asociază în fascicule groase şi capacităţile viscoelastice ale dermului se reduc progresiv. Tot cu înaintarea în vîrstă, sînt incluse în fibrele de colagen şi glicoproteine, conţinînd 79—80 mg hexozamine la 100 g greutate uscată şi avînd o compoziţie macromoleculară similară cu aceea a glicoproteinelor serice. În lucrările noastre, menţionate în paginile anterioare, am constatat că, materialul metacromatic care apare în unele fibre colagene după eliminarea prin colagenază a substratului fucsinofilic, este rezistent la toate enzimele glicolitice, sugerînd că ar fi vorba de condroitin-sulfatul B sau alt tip de substanţă heparinică. De asemenea, în aceleaşi fibre, am evidenţiat şi glicoproteine bogate în acid sialic[1105]. Anumiţi cercetători susţin că glicoproteinele din piele ar avea o organizare macromoleculară cu totul aparte, caracterizată prin prezenţa acidului glucuronic, precum şi prin prezenţa unei pentoze de tipul ribozei [976]. Toate aceste substanţe ar juca rol de ciment stabilizator interfibrilar, contribuind, o dată cu înaintarea în vîrstă, la mărirea stabilităţii structurale a fibrelor. În acelaşi timp, integrarea lor în complexele fibrilare creiază posibilitatea degradării acestor fibre, nu numai prin efecte colagenolitice, ci şi glicolitice, eliminarea cimentului interfibrilar dînd posibilitatea unei dizolvări mai rapide a fibrilelor izolate. Acest mecanism suplimentar trebuie luat în considerare cînd se studiază reducerea importantă de fibre de colagen în derm în cursul senescenţei, în boli cronice şi, chiar, în sclerodermii. Ar mai fi de menţionat că, în ultimii ani, au fost identificate în ţesutul conjuctiv al dermului atît heparitin-sulfatul [954], cît şi keratosulfatul[77], ceea ce permite să se susţină existenţa tuturor tipurilor de mucopolizaharide acide, cunoscute pînă acum. Această bogăţie şi varietate este în neconcordanţă cu cantitatea extrem de redusă de substanţă fundamentală în zonele profunde ale dermului, uneori neidentificabilă la microscopul optic. De aceea trebuie admis că, în mod cu totul particular, mucopolizaharidele acide sînt incluse în structurile colagene, realizînd complexe macromoleculare a căror dinamică biochimică variază în raport cu vîrsta.

Scanned with OKEN Scanner

În sprijinul acestui mod particular de organizare macromoleculară pledează numeroase rezultate ale studiilor pe material uman și experimental. Astfel la șobolanul în vîrstă de 2—5 zile, se poate identifica, în substanța fundamentală a pielii, atît glucozamina, cît și galactozamina. Între zilele 25 și 90 ale vieții, galactozamina dispare din substanța fundamentală, datorită includerii condroitin-sulfaților în structuri fibrilare. Acest proces este reflectat și de creșterea progresivă a galactozaminei în materialul extras din fibre [880]. Dimpotrivă, cantitatea de glucozamină din substanța fundamentală rămîne în limite apropiate, sugerînd că cea mai mare parte a acidului hialuronic are o topografie extrafibrilară.

Toate aceste modificări ale colagenului, elastinei și mucopolizaharidelor, care apar în cursul îmbătrînirii organismului, au o mare influență asupra capacităților funcționale ale pielei. S-a sugerat că aceste complexe macromoleculare s-ar găsi în stare nativă într-o continuă transformare dinamică, caracterizată prin prezența unui gel cu grade diferite de densitate structurală, incluzînd substanța fundamentală și fibrele. Acest gel ar fi total neorientat, dispoziția macromoleculelor fiind determinată de fiecare factor stresant care acționează asupra pielii și caracterizată prin aranjarea în direcția liniilor de forță [529]. În acest tip de organizare, fibrele superficiale „absorb" *stress*-urile și le transmit întregei rețele fibrilare a dermului, iar, după ce forța mecanică nu se mai exercită, întregul derm își reia organizarea macromoleculară, neordonată, inițială. Adaptarea la acest tip de reacție s-ar face printr-un sistem de cuplare a rețelelor tridimensionale, asemănătoare ochiurilor unei plase de pescar care, în orice direcție ar fi întinsă, firele constitutive se alungesc paralel unul cu altul și, toate la un loc, paralel cu direcția forței de tracțiune. Spațiile interfibrilare se reduc o dată cu această orientare paralelă, apărînd o deshidratare bruscă, asociată cu o „expulzare" a substanței fundamentale dintre fibre. Dacă forța de presiune a fost mare sau de lungă durată, revenirea la starea inițială se face greu, tocmai datorită eliminării dintre fibre a substanței fundamentale care asigură proprietățile visco-elastice ale pielii. Acest proces de revenire este, în parte, condiționat și de capacitatea funcțională a fibrelor elastice care, dispuse helicoidal în jurul celor colagene, acumulează, în cursul extensiunii determinată de factorul stresant, energia necesară revenirii la lungimea normală a fibrelor [379]. În lumina acestor date, extrem de rezumative, privind biomecanica pielii, sînt mai ușor de înțeles alterările funcționale ce rezultă din modificările organizării macromoleculare determinate de procesul de îmbătrînire. Departe de a fi limitate numai la numărul de legături intermoleculare ale fibrelor de colagen, aceste modificări privesc toate tipurile de mucopolizaharide și glicoproteine prezente în derm, structurile elastice și variate tipuri particulare de complexe macromoleculare adecvate biomecanicii pielii.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL III-LEA

MODIFICĂRILE ORGANIZĂRII MACROMOLECULARE A ŢESUTULUI CONJUNCTIV DETERMINATE DE PROCESE PATOLOGICE

Modificările organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv determinate de procese patologice, vor fi descrise în două subcapitole. Primul se referă la alterările cu caracter general, comune tuturor afecţiunilor în care există inflamaţii şi reacţii imunologice. Al doilea subcapitol conţine alterările cu caracter particular, determinate de natura factorilor etiologici şi de mecanismele patogenice prin intermediul cărora acţionează, dînd naştere unor boli cu largă răspîndire în masă, cum ar fi ateroscleroza, hipertensiunea arterială de origine renală, hepatita cronică şi cirozele hepatice, variate forme de reumatism, otoscleroza. Anumite date, de interes etiopatogenic special, se vor referi la modificările organizării macromoleculare în unele boli ereditare ale ţesutului conjunctiv.

Întrucît în capitolul anterior s-au prezentat rezultatele a numeroase lucrări privind modificările organizării macromoleculare în boli ale senescenţiei, sau asociate perioadei de senescenţă, nu vom mai acorda un spaţiu special emfizemului pulmonar, osteoartrozelor şi osteoporozelor. De asemenea, nu am considerat necesar să analizăm şi alte aşa-zise „colagenoze", în afara variatelor tipuri de reumatism, întrucît din studiul lor nu s-au evidenţiat alterări particulare ale organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv.

Scanned with OKEN Scanner

INFLAMAȚIA

Larga utilizare în medicină a terapiei specifice și, mai ales, a terapiei nespecifice, impune ca experiența clinică să fie mereu întregită cu o cunoaștere cît mai adîncă a mecanismelor patogenice ale inflamației.

Cînd inflamația apare ca un proces de adaptare adecvat, nu trebuie interceptată terapeutic; dimpotrivă, cînd se dezvoltă neadecvat, este necesar să fie inhibată prin intermediul medicației. Limita dintre aceste două tipuri de procese reacționale este, de cele mai multe ori, extrem de greu de precizat. De aceea, momentul, doza și durata tratamentelor cu substanțe din grupul glucocorticoizilor și acidului salicilic, cu derivați pirazolonici și chinolinici, cu săruri de aur, cu antihistaminice, cu radioterapie sau electroterapie etc. constituie subiecte încontinuu dezbătute în literatura de specialitate [372].

În rîndurile care urmează vom prezenta modul în care este alterată organizarea macromoleculară a diferitelor structuri constitutive ale țesutului conjunctiv, de-a lungul variatelor etape succesive ale procesului inflamator, insistînd asupra importanței convertirii normostabilității în hipo-și hiperstabilitate structurală.

Stadiul de hipostabilizare structurală

Toate procesele inflamatoare, indiferent de natura agentului etiologic, încep printr-o fază de hipostabilizare structurală, caracterizată prin desfacerea legăturilor dintre macromoleculele substanței fundamentale, ale membranelor bazale și ale fibrelor reticulinice, colagene și elastice. Intensitatea acestui proces variază în limite foarte largi, de la aspecte care nu pot fi evidențiate de microscopia fotonică sau electronică, pînă la imagini tipice de necroză.

Vom analiza modul cum apare procesul de hipostabilizare structurală și consecințele sale, la nivelul fiecărui tip special de organizare macromoleculară a țesutului conjunctiv.

SUBSTANȚA FUNDAMENTALĂ

Diseminarea agentului nociv, a toxinelor și a fermenților elaborați, de-a lungul interstițiilor conjunctivo-vasculare, alterează cantitativ și calitativ componentele structurale cele mai labile ale acestor interstiții : muco-
 polizaharidele din substanța fundamentală. Lezarea parenchimurilor

Scanned with OKEN Scanner

se repercutează, de asemenea, asupra substanţei fundamentale, prin intermediul metabolismului celular modificat. În special, eliberarea de enzime lizozomiale, de tipul glucozidazelor şi proteazelor, reprezintă unul dintre mecanismele fundamentale care determină hipostabilizarea structurală a ţesutului conjunctiv. Astfel, apar „leziunile histochimice" din primul stadiu evolutiv al inflamaţiei, exteriorizînd o dereglare, mai mult sau mai puţin gravă, a raporturilor capilare-celule şi celule-capilare.

După cum s-a mai menţionat, în condiţii fiziologice, substanţa fundamentală are un punct izoelectric între 2 şi 3, indicînd predominanţa funcţiilor acide. Aceste funcţii sînt purtate de grupele sulfat şi carboxil ale mucopolizaharidelor şi de grupele carboxil ale acidului sialic şi ale acizilor aspartic şi glutamic. Deşi mucopolizaharidele nu reprezintă decît 0,5 — 2 % din totalul componentelor substanţei fundamentale, ele asigură o mare plasticitate, necesară circulaţiei, în dublu sens, a anaboliţilor şi cataboliţilor.

Se admite, că, în deosebi, variaţiile gradului de polimerizare a acidului hialuronic ar constitui mecanismul principal care asigură dinamica permeabilităţii substanţei fundamentale a ţesutului conjunctiv. Existenţa unui paralelism între depolimerizarea *in vitro* a acestui mucopolizaharid şi modificările de permeabilitate *in vivo* a substanţei fundamentale, pledează pentru această ipoteză. Astfel, o serie de substanţe ce depolimerizează *in vitro* acidul hialuronic, cum ar fi acidul ascorbic, cisteina, sau peroxidul de hidrogen măresc, *in vivo*, permeabilitatea interstiţială; dimpotrivă, substanţele care inhibă depolimerizarea *in vitro* (acidul salicilic, salicilatul de sodiu, testosteronul), reduc permeabilitatea ţesutului conjunctiv *in vivo* [311]. Importanţa rolului jucat de acidul hialuronic în permeabilitatea interstiţială trebuie corelată cu greutatea sa moleculară extrem de mare şi cu dispoziţia în reţea a aglomerărilor macromoleculare. S-a constatat că, la o concentraţie de numai 0,01 — 0,1%, macromoleculele de acid hialuronic difuzează în mod egal în toată soluţia şi încep să se dispună în reţele. Cu cît concentraţia creşte, aceste reţele prezintă ochiuri din ce în ce mai strînse, dispărînd macromoleculele izolate [633]. *In vivo*, concentraţia de acid hialuronic depăşeşte în general 0,1%, ceea ce sugerează că în toate interstiţiile ar exista reţele tridimensionale ce se interpun între pereţii capilarelor şi celule, ca şi între fibrele de colagen, elastină, reticulină şi membrane bazale.

Se presupune că plasticitatea substanţei fundamentale ar fi dependentă de o organizare plurifazică, avînd doi poli extremi: o fază foarte permeabilă, bogată în apă şi săracă în coloid şi o fază greu permeabilă, săracă în apă şi bogată în coloid. Prima conţine mucopolizaharide cu lanţuri macromoleculare scurte, permiţînd formarea de ochiuri largi, pline cu apă; a doua conţine mucopolizaharide cu lanţuri macromoleculare lungi, puternic intricate, formînd o reţea cu ochiuri strînse în care rămîne foarte puţin lichid (*fig. 52, I*). Aceste două tipuri extreme ar cuprinde, între ele, numeroase faza intermediare, ce s-ar găsi în echilibru labil, permiţînd înlocuirea rapidă a unei configuraţii cu alta. S-a sugerat că

Scanned with OKEN Scanner

starea fizico-chimică și particularitățile biologice ale substanței fundamentale ar reflecta, în primul rînd, tipul fazei coloidale predominante [378].

Anumite aspecte ale acestei ipoteze pot fi extinse și în domeniul patologiei generale. Astfel, pe baza analizelor histochimice efectuate, am sugerat existența a trei forme de alterări în organizarea macromole-

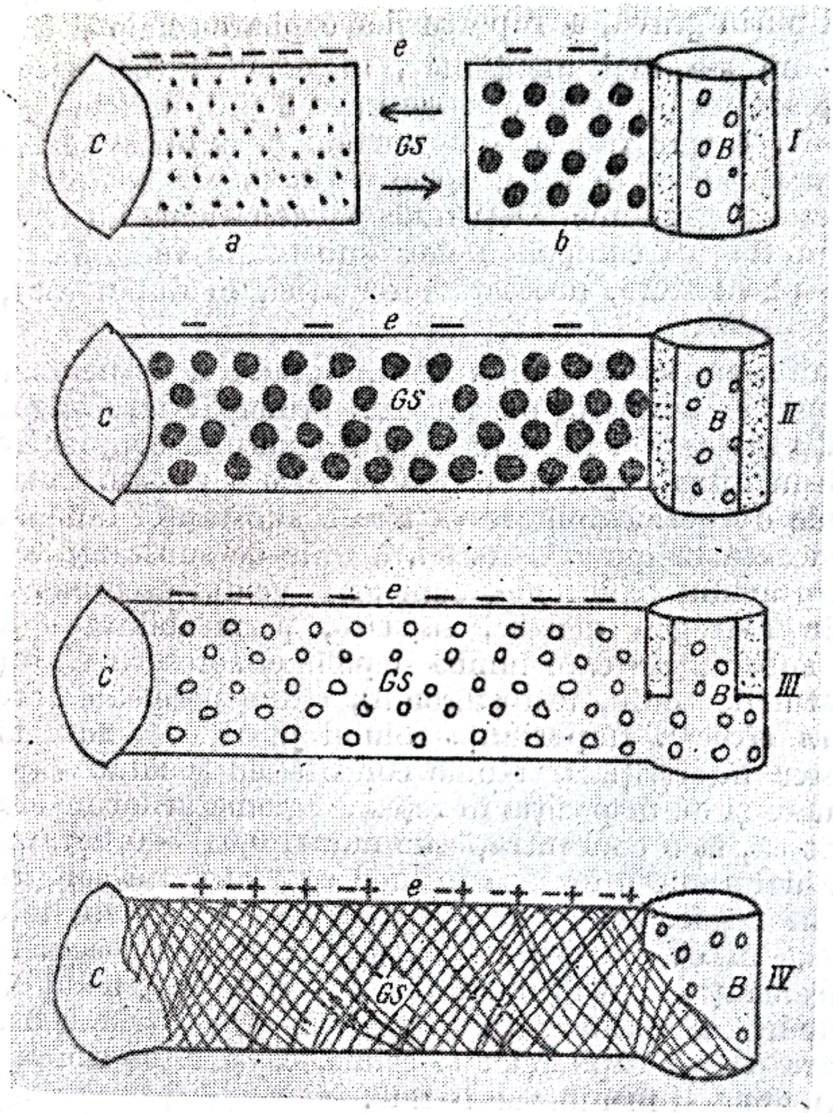


Fig. 52. Schema organizării macromoleculare a substanței fundamentale „normale" (I) și a celor trei tipuri de substanță fundamentală, întîlnite în cursul procesului inflamator :II) modificată; III) de „substituție"; (IV) nefuncțională.

Legendă: a) substanță fundamentală bogată în coloid și săracă în apă; b) substanță fundamentală bogată în apă și săracă în coloid; *B*, capilar sanguin; *C*, celulă; *e*, sarcini electrice negative de suprafață (VELICAN C. [1102]).

culară substanței fundamentale, decelabile în cursul inflamațiilor:. substanțe fundamentale *modificate*, *de „substituție"* și *nefuncționale* [1102]

Substanţa fundamentală modificată (*fig. 52, II*) corespunde inflamaţiei seroase a vechilor patologişti. Rezultă din îmbibarea interstiţiilor conjunctivo-vasculare cu transudat, apărînd o exoseroză ce duce la edemul, atît de des întîlnit la examenul clinic sau pe preparatele microscopice. Din punct de vedere fizico-chimic şi histochimic, se constată un gel mai puţin vîscos, mai bogat în apă, iar sarcinile electronegative de suprafaţă sînt mai puţin concentrate. Aceste modificări se însoţesc de o creştere a permeabilităţii şi de o scădere a selectivităţii. Ele sînt rapid compensate printr-o depolimerizare a mucopolizaharidelor din fazele mai dense ale substanţei fundamentale, completată, ulterior, de o sinteză accentuată. Astfel, hipostabilitatea structurală (determinată de acţiunile competitive ale electroliţilor din lichidul extravazat, care duc la ruperea unor legături electrostatice şi a unor punţi de hidrogen) este treptat normalizată şi procesul evoluează spre *restitutio ad integrum*. Dacă, însă, circulaţia venoasă şi limfatică sînt deficitare, acumularea continuă de lichid extravazat nu mai poate fi compensată prin neoformări de geluri hidrofile. Faza de hipostabilitate structurală se prelungeşte, depolimerizarea se accentuează şi substanţa fundamentală respectivă devine factor de dezechilibru între sînge şi celule, împiedicînd refacerea homeostaziei interstiţiale. În astfel de condiţii, metabolismul parenchimelor este progresiv alterat, iar leziunea evoluează fie spre necroză, fie spre dezvoltarea unui ţesut de granulaţie, fie spre formarea unor complexe macromoleculare patologice ce acţionează ca nişte corpi străini iritanţi. Singura particularitate histochimică a substanţei fundamentale, astfel modificată, este absenţa aproape totală a coloraţiilor pentru evidenţierea mucopolihaharidelor, datorită dizolvării lor progresive în lichidul extravazat. Numai bazofilia după esterificare sulfurică apare, uneori, pozitivă.

Substanţa fundamentală de „substituţie“ (*fig. 52, III*) a fost, de asemenea identificată de noi pe baza unor analize histochimice şi corespunde, în parte, cu inflamaţia exsudativă a vechilor patologişti. Este tot consecinţa unei conversiuni a normostabilităţii substanţei fundamentale în hipostabilitate, ca urmare a unei depolimerizări masive şi rapide a mucopolizaharidelor şi a complexelor mucoproteice. Această depolimerizare poate rezulta, de exemplu, din acţiunea hialuronidazelor streptococice, sau din eliberarea unor enzime lizozomiale cu acţiune hialuronidazică. După degradarea complexelor macromoleculare, circulaţia în dublu sens, între capilare şi celule şi între celule şi capilare, este profund alterată, ameninţînd supravieţuirea parenchimelor. Depolimerizarea complexelor macromoleculare locale este rapid compensată prin formarea unei substanţe fundamentale de „substituţie”. Ea rezultă dintr-o concentraţie adecvată a glicoproteinelor serice extravazate, creind o stare nouă, de gelificare şi de selectivitate a permeabilităţii interstiţiale, care permite continuarea metabolismului celulelor. Este vorba de formarea unui coacervat complex, avînd la suprafaţă numeroase sarcini negative libere, reprezentate de radicalii carboxilici ai acidului sialic. Substanţa fundamentală de „substituţie” este, astfel, capabilă să asigure trecerea cati-

Scanned with OKEN Scanner

onilor şi să constituie o anumită barieră pentru anioni. Poate fi, deci, asemănată cu o răşină schimbătoare de cationi, ca toate substanţele fundamentale din organism. Capacitatea de distribuire a electroliţilor şi a moleculelor polare, bazată pe permeabilitatea selectivă, datorită sarcinilor imobile purtate de grupele carboxilice ale acidului sialic şi ale acizilor aspartic şi glutamic, poate permite o anumită continuitate în metabolismul specific al diferitelor parenchime, în care are loc procesul inflamator. După cîteva zile, substanţa fundamentală de „substituţie" este, la rîndul ei, depolimerizată, pinocitată sau eliminată sub formă de produşi dializabili şi înlocuită cu o organizare macromoleculară asemănătoare celei anterioare imflamaţiei. Din punct de vedere histochimic, aspectul cel mai particular evidenţiat de noi este colorabilitatea cu albastru alcian, legată de prezenţa unui substrat ce dispare după incubaţie cu sialidază. Reacţia PAS apare pozitivă, fiind total blocată de acetilare şi total deblocată prin saponificare. Incubaţiile cu tripsină sau pepsină reduc intensitatea sa, demonstrînd că fracţiile glucidice PAS-reactive sînt legate de proteine. Aceste fracţii sînt alcătuite din hexoze, acid sialic, şi probabil, fucoză. Substratul cel mai important ca reactivitate histochimică a fost sugerat de noi ca fiind reprezentat de seromucoidul extravazat.

Importanţa formării substanţei fundamentale de „substituţie", care asigură, timp de mai multe zile, supravieţuirea celulelor din ţesutul conjunctiv şi parenchimele inflamate, este uneori dublată şi prin dispariţia membranelor bazale pericelulare sau capilare. Enzimele eliberate de focarul inflamator sînt uneori atît de active, încît dezorganizează complexele glicoprotidice şi glicoprotidice-colagene ce alcătuiesc textura macromoleculară a acestor membrane. Rezultă un proces de conversiune a normostabilităţii în hipostabilitate, mergînd, uneori, pînă la totala desfacere a complexelor macromoleculare, în compuşi dializabili. În astfel de condiţii, membranele bazale nu mai pot alcătui o barieră selectivă adiţională pentru circulaţia interstiţială şi diapedeza elementelor sanguine. Acest rol revine tot substanţei fundamentale de „substituţie" care preia, în parte, şi funcţiile membranelor bazale dispărute. În acelaşi timp, permiţînd neoformarea capilară, mobilizarea celulelor endoteliale şi diapedeza leucocitelor, ea crează condiţiile dezvoltării ulterioare a ţesutului de granulaţie.

Substanţa fundamentală nefuncţională (*fig. 52, IV*), corespunde exudatului fibrinos, fibrinohemoragic şi fibrinopurulent al vechilor patologişti. Apare ca urmare a unei extravazări masive şi brutale, în interstiţii, a proteinelor şi glicoproteinelor plasmatice, care se acumulează în gelurile preexistente, blocînd spaţiile dintre reţelele macromoleculare şi neutralizînd sarcinile electronegative ale mucopolizaharidelor. Permeabilitatea totală şi selectivă este, astfel, profund modificată de invazia acestor componente plasmatice. Produşii metabolismului celular alterat vin, ulterior, să se adauge acestei substanţe fundamentale patologice. Apar, astfel, condiţiile favorabile constituirii de complexe macromoleculare neadecvate homeostaziei interstiţiilor, precum şi apariţia unei stări hipoxice

Scanned with OKEN Scanner

onilor și să constituie o anumită barieră pentru anioni. Poate fi, deci, asemănată cu o rășină schimbătoare de cationi, ca toate substanțele fundamentale din organism. Capacitatea de distribuire a electroliților și a moleculelor polare, bazată pe permeabilitatea selectivă, datorită sarcinilor imobile purtate de grupele carboxilice ale acidului sialic și ale acizilor aspartic și glutamic, poate permite o anumită continuitate în metabolismul specific al diferitelor parenchime, în care are loc procesul inflamator. După cîteva zile, substanța fundamentală de „substituție" este, la rîndul ei, depolimerizată, pinocitată sau eliminată sub formă de produși dializabili și înlocuită cu o organizare macromoleculară asemănătoare celei anterioare imflamației. Din punct de vedere histochimic, aspectul cel mai particular evidențiat de noi este colorabilitatea cu albastru alcian, legată de prezența unui substrat ce dispare după incubație cu sialidază. Reacția PAS apare pozitivă, fiind total blocată de acetilare și total deblocată prin saponificare. Incubațiile cu tripsină sau pepsină reduc intensitatea sa, demonstrînd că fracțiile glucidice PAS-reactive sînt legate de proteine. Aceste fracții sînt alcătuite din hexoze, acid sialic, și probabil, fucoză. Substratul cel mai important ca reactivitate histochimică a fost sugerat de noi ca fiind reprezentat de seromucoidul extravazat.

Importanța formării substanței fundamentale de „substituție", care asigură, timp de mai multe zile, supraviețuirea celulelor din țesutul conjunctiv și parenchimele inflamate, este uneori dublată și prin dispariția membranelor bazale pericelulare sau capilare. Enzimele eliberate de focarul inflamator sînt uneori atît de active, încît dezorganizează complexele glicoprotidice și glicoprotidice-colagene ce alcătuiesc textura macromoleculară a acestor membrane. Rezultă un proces de conversiune a normostabilității în hipostabilitate, mergînd, uneori, pînă la totala desfacere a complexelor macromoleculare, în compuși dializabili. În astfel de condiții, membranele bazale nu mai pot alcătui o barieră selectivă adițională pentru circulația interstițială și diapedeza elementelor sanguine. Acest rol revine tot substanței fundamentale de „substituție" care preia, în parte, și funcțiile membranelor bazale dispărute. În același timp, permițînd neoformarea capilară, mobilizarea celulelor endoteliale și diapedeza leucocitelor, ea crează condițiile dezvoltării ulterioare a țesutului de granulație.

Substanța fundamentală nefuncțională (*fig. 52, IV*), corespunde exudatului fibrinos, fibrinohemoragic și fibrinopurulent al vechilor patologiști. Apare ca urmare a unei extravazări masive și brutale, în interstiții, a proteinelor și glicoproteinelor plasmatice, care se acumulează în gelurile preexistente, blocînd spațiile dintre rețelele macromoleculare și neutralizînd sarcinile electronegative ale mucopolizaharidelor. Permeabilitatea totală și selectivă este, astfel, profund modificată de invazia acestor componente plasmatice. Produșii metabolismului celular alterat vin, ulterior, să se adauge acestei substanțe fundamentale patologice. Apar, astfel, condițiile favorabile constituirii de complexe macromoleculare neadecvate homeostaziei interstițiilor, precum și apariția unei stări hipoxice

Scanned with OKEN Scanner

prelungite, ducînd la necroze celulare. Coloraţiile de rutină evidenţiază prezenţa de reţele de fibrină, de hematii, de leucocite şi a unor mase eozinofilice astructurate. Tehnicile de histochimie se caracterizează printr-o mare varietate a reacţiilor. Deşi există o importantă cantitate de acid sialic, evidenţierea acestui hidrat de carbon pare mai puţin constantă, decît în substanţa fundamentală de „substituţie". Este probabil că aceste rezultate se datoresc blocării grupelor carboxil ale acidului sialic de către grupele amino ale proteinelor extravazate, precum şi apariţiei de legături ce rezistă digestiei cu sialidază. Pretratarea secţiunilor cu pepsină sau tripsină, eliminînd aceste proteine, favorizează hidroliza ulterioară a acidului sialic. Blocajul reacţiei PAS după acetilare este mai puţin net decît în substanţa fundamentală de „substituţie", indicînd participarea, la apariţia acestei reacţii, a anumitor grupări ale proteinelor. În schimb, apar mai evidente rezultatele tehnicilor de colorare selectivă a variaţi acizi aminaţi (tirozină, cistină, cisteină). Dacă substanţa fundamentală nefuncţională nu poate fi degradată prin mecanismele de care dispune focarul inflamator, ea rămîne ca un „corp străin", favorizînd evoluţia cronică a inflamaţiei şi asocierea proceselor imunologice, cu depunere de fibrinoid şi hialin. Ea poate, de asemenea, să constituie baza dezvoltării unei scleroze anarhice şi retractile.

Cele trei tipuri de substanţă fundamentală, histochimic evidenţiabile, existente în focarele de inflamaţie, pot fi întîlnite fie izolate, fie intricate. Tehnicile de histochimie permit să se individualizeze particularităţile lor topochimice şi să se interpreteze consecinţele funcţionale, legate de fiziopatologia clinică şi de terapeutică.

MEMBRANE BAZALE ŞI FIBRE RETICULINICE

Alterările organizării macromoleculare a membranelor bazale şi a fibrelor reticulinice, în cursul fazei de hipostabilizare structurală a procesului inflamator, au fost extrem de puţin studiate. De aceea ne vom referi numai la rezultatele unor lucrări personale. Ele subliniază, în primul rînd, că, persistenţa unui edem poate duce, în timp, la dizolvarea fracţiei glucidice din complexul glucoprotidic ce alcătuieşte fibrele. Deoarece fracţiile glucidice sînt bogate în hexoze, ale căror grupări hidroxil reprezintă sediul impregnabilităţii argentice [1126], apare o reducere progresivă a intensităţii impregnaţiei, proces descris, de multe ori, ca o dispariţie a fibrelor însăşi. *In vitro*, aspecte similare au fost obţinute prin tratarea secţiunilor (fixate în Carnoy, sau nefixate) cu o soluţie de ser fiziologic, timp de 24—28 de ore, la 37°C (*fig. 53*). Efectele serului fiziologic se traduc nu numai prin simpla dizolvare a hexozelor, ci şi prin înlăturarea hexozaminelor, substanţe care, în lumina cercetărilor noastre, ar juca rolul de ciment care conectează reţelele reticulinice de pereţii capilari [1138]. Drept urmare, eliminarea lor determină un anumit grad de dislocare şi derulare a acestor reţele, aşa cum se vede în microfotografia menţionată. Nu avem încă

Scanned with OKEN Scanner

date concludente spre a evalua importanța acțiunii hidrolazelor lizozomiale asupra stabilității structurale a membranelor bazale și a fibrelor reticulinice. *In vitro*, sînt necesare concentrații mari de tripsină sau pepsină spre a produce degradarea lor, iar colagenazele nu au efecte evidente. În ceea ce privește glucozidazele, din rezultatele analizelor noastre, numai sialidaza (*fig. 54*) a dezorganizat, în anumite teritorii limitate ale membranelor bazale capilare, complexele macromoleculare constitutive ale acestor membrane [1107], [1131], în timp ce, beta-glucozaminidaza (lizozimul) a apărut, în investigațiile noastre, capabilă să producă o dislocare și o dispersie a rețelelor reticulinice din ficat, plămîni, miocard și splină [1126], [1138], [1139]. Un factor important în procesul de hipostabilizare structurală a membranelor bazale în cursul proceselor imflamatoare, pare să fie granulocitul neutrofil. Experimental, leziunea cu caracter distructiv care apare la nivelul membranelor bazale ale glomerulului renal la iepure, indusă cu ser antimembrană bazală, s-a dovedit a fi strict dependentă de afluxul acestor celule [474]. Dacă granulocitele neutrofile erau degradate înaintea inducerii nefritei experimentale, alterarea histologică a membranei bazale și modificările de permeabilitate nu mai apăreau. Ar rezulta, din aceste investigații, că, în glomerulonefrita nefrotoxică experimentală, antigenii din membrana bazală glomerulară apar în urină numai dacă granulocitele neutrofile participă la procesul de lezare a complexelor macromoleculare, ce constituie această membrană. Același mecanism a fost incriminat în degradarea membranelor bazale capilare, evidențiabilă în cursul fenomenului Arthus, ca și în alte procese în care există condițiile locale ale unei atracții chemotactice a granulocitelor neutrofile [582].

FIBRA DE GOLAGEN

Problema modului în care „dispar" fibrele de colagen în cursul inflamației, constituie un subiect de continuă și intensă preocupare.

În condiții fiziologice de pH, temperatură și concentrație ionică, aceste fibre nu par să fie degradate decît de enzime specifice, de tipul colagenazei. Absența acestor fermenți în majoritatea organelor și țesuturilor investigate, contrastează cu frecvența cu care apare alterată organizarea macromoleculară a fibrelor, sugerînd noi direcții de investigație. La aceasta a contribuit și constatarea, că, masiva degradare pe care o suferă colagenul din uter după naștere se produce într-un organ în care nu au fost identificate activități colagenazice. Ridică, de asemenea, numeroase semne de întrebare, în același domeniu, mecanismul prin care sînt rezorbite firele de catgut, indiferent de locul unde s-a făcut sutura. Revenind la problema inflamației, trebuie menționat că, în focarele pline cu transudat sau exudat, nu mai există același pH și aceeași concentrație ionică, ca în condiții fiziologice. De aceea, este posibil, ca, modificările de mediu să influențeze organizarea macromoleculară a fibrelor de colagen, făcîndu-le susceptibile să fie digerate de către proteaze nespecifice, față de care

Scanned with OKEN Scanner

sînt rezistente în afara focarului inflamator. În acest sens, menționăm că fibra de colagen, izolată dintr-un țesut supus la puseuri inflamatorii repetate, cum ar fi sinoviala bolnavilor cu artrită reumatoidă, a fost mult mai rapid digerată de proteaze nespecifice decît cea din sinoviala normală, deși, electronomicroscopic, nu au putut fi evidențiate modificări ultrastructurale [1036]. Acesta ar sugera că „leziunea" interesează legăturile intermoleculare, care sînt parțial desfăcute în cursul procesului inflamator, rezultînd, ceea ce noi numim : stare de „hipostabilitate structurală" [1125, 1127].

În plus, anumite rezultate experimentale demonstrează că, după injectare în piele de necrozină (inflamație tip MENKIN) și digestie cu tripsină, se eliberează o cantitate mai mare de hidroxiprolină (0,29 mg %), decît la lotul supus doar digestiei cu tripsină (0,13 mg %). Aceste rezultate sugerează că produșii caracteristici inflamației acute exercită o acțiune de hipostabilizare structurală a fibrelor colagene, făcîndu-le mai ușor atacabile de către fermenți nespecifici [424]. Zona în care colagenul este modificat structural se întinde și în afara limitelor aparente ale focarului inflamator, iar procesul de „topire" a fibrelor colagene, în aceste teritorii perilezionale, este cu atît mai accentuat, cu cît se exercită asupra lor *stress*-uri mecanice mai importante [497]. Scăderea colagenului din zonele distale ale focarului inflamator a fost constatată și după injectarea intradermică de ulei de croton, sugerînd că acest proces nu pare să fie corelat cu tipul agentului etiologic [500]. În jurul inciziilor aseptice, liza fibrelor de colagen poate fi clar demonstrată pe o distanță pînă la aproximativ 1,85 mm de o parte și de alta a inciziei, apărînd mai puțin netă între 1,85 și 3,70 mm [307]. De aceea s-a sugerat că degradarea colagenului insolubil și, consecutiv, creșterea cantitativă a fracției solubile a colagenului, ar putea constitui o parte integrantă a mecanismului de adaptare a plăgilor. Această ipoteză este, în parte, susținută de constatarea că țesutul de granulație apare mai repede cînd există în plagă o cantitate mai mare de colagen neutrosolubil ; aceeași fracție ar influența favorabil și invăzia celulară [1149].

În afara acestor mecanisme încă puțin precizate, de o mare importanță pare să fie capacitatea germenilor patogeni de a elabora fermenți cu acțiune colagenolitică. În acest sens, s-au propus clasificări ale bacteriilor gram-negative după capacitatea lor de a degrada colagenul [191].

În infecțiile oculare cu *Pseudomonas aeruginosa*, fibrele de colagen din cornee sînt foarte rapid degradate de enzima sau enzimele eliberate de acest microorganism, ele acționînd cu intensitatea unei colagenaze clostridiale [970]. De asemenea, proteazele eliberate de *Aspergillus oryzae* produc o rupere a lanțurilor polipeptidice ale colagenului, la nivelul zonelor apolare ale macromoleculei, bogate în secvența glicină-prolină-hidroxiprolină [808]. Fibrele de colagen puse, *in vitro*, în contact cu o colonie de stafilococi, și-au modificat proprietățile fizico-chimice, prezentînd o rezistență mai redusă la digestia cu tripisină, o reducere a capacității de agregare a macromoleculelor și o creștere a tendinței de dispersie [874]. Pe aceeași linie de cercetare, menționăm că puroiul din infecții cu stafilococ degradează rapid fibrele de colagen din matricea cartilajului articular [247]. Ar mai fi de reținut acțiunea colagenolitică netă exercitată de produșii elaborați de *Fasciola hepatica*, ca și de anumite bacterii aerobe sau de anumiți fungi, frecvent asociați patologiei umane [899].

Astfel, deși există, în mod fiziologic, un anumit grad de activitate colagenolitică în omogenatele de ficat, rinichi, creier, splină, timus, duoden

Scanned with OKEN Scanner

și, mai ales, în os și în suspensiile de granulocite neutrofile [949], [1197], asocierea posibilă a unor agenți supraadăugați, care elaborează fermenți de tipul colagenazei, trebuie luată permanent în considerare. De aceea, de multe ori este greu de precizat, dacă, degradarea rapidă a unor fibre de colagen, în focarele inflamatoare, rezultă dintr-o potențare a unor mecanisme fiziologice, sau din intervenția unor agenți colagenolitici exogeni. Așa se întîmplă, de exemplu, în gingiile inflamate ale bolnavilor cu paradentoze, care prezintă o dispariție importantă a structurilor fucsinofile. Activitatea colagenolitică a apărut cu atît mai intensă, cu cît inflamația era mai evidentă și cantitatea de gamma-globuline mai ridicată [124]. Faptul ca acțiunea colagenolitică a putut fi blocată prin repetate înghețări și dezghețări ale țesutului inflamat, ca și prin adăugare de puromicină la mediul de cultură a celulelor gingivale, sugerează că ar fi vorba de o activitate celulară, din care rezultă o enzimă termolabilă, similară colagenazei bacteriene [360]. Sînt de reținut și observațiile privind capacitatea colagenolitică crescută a ficatului cirotic (conținînd numeroase infiltrate inflamatoare în spațiile porte lărgite), ca și a granulomului experimental cu ulei de terebentină [91]. Extractele obținute din aceste focare inflamatoare au un efect litic mai pronunțat asupra fracției acidosolubile a colagenului, decît asupra celei insolubile. Efectul colagenolitic a apărut asociat și cu proteoliza nespecifică a hemoglobinei, fibrinogenului, cazeinei și serumalbuminei, incriminîndu-se ca agent principal catepsinele. Mai menționăm că, în ficat, activitatea colagenolitică a devenit maximă în perioada în care rezorbția fibrelor era maximă, observație făcută și în granuloamele experimentale. Faptul că, după administrare de vitamina A, capacitatea de degradare a fibrelor de colagen crește, a sugerat participarea enzimelor lizozomiale în faza inițială a acestui proces [92]. În același sens ar putea pleda și constatarea, că, extractele de piele cu inflamație acută degradează mai intens fibrele de colagen, decît cele cu inflamație cronică sau fără inflamație [424]. Poate fi asociată aceleiași ipoteze, constatarea că plăgile pierd cea mai mare parte din colagenul insolubil în cursul evoluției spre necroză, cînd sînt eliberate din celule enzimele lizozomiale. În țesutul necrozat s-au identificat fermenți colagenolitici latenți, care pot fi activați dacă sînt supuși unei digestii de scurtă durată cu tripsină [503]. În culturi de țesuturi, atît activitatea colagenolitică, mai discretă, a celulelor normale, cît și cea potențată, a celulelor din focarele inflamatoare, sînt blocate prin adăugare de ser total. Aceste rezultate au sugerat ipoteza existenței unui „sistem colagenolitic" fiziologic, care devine extrem de activ acolo unde apar focare inflamatoare și infiltrații celulare intense [427]. În încheierea acestor date, menționăm că nu s-a obținut, *in vitro*, degradarea colagenului „pur" după tratare cu: exudat pleural de la pacienți cu pneunomie lobară; necrozină de iepure, obținută din fracția euglobulinică a exudatelor inflamatoare; necrozină de cobai; necrozină din exudatul pleural de la om; omogenat leucocitar de la subiecți normali; omogenat leucocitar de la bolnavi cu leucemie cronică mieloidă. Degradarea colagenului a apărut, însă, dacă, la aceste

Scanned with OKEN Scanner

preparate, se adăuga şi tripsină, ceea ce a dus la concluzia că variate substanţe „anormale" ce se găsesc în focarul inflamator pot „sensibiliza" colagenul, spre a-l face atacabil de către proteazele nespecifice prezente în toate ţesuturile şi organele [423].

Stadiul de normostabilizare structurală

Acest stadiu se caracterizează prin eliminarea produşilor rezultaţi din liza celulelor locale şi de infiltraţie, din degradarea substanţei fundamentale şi a fibrelor, precum şi prin eliminarea componentelor serice extravazate. Această „curăţire" a plăgii permite refacerea treptată a unei organizări macromoleculare, asemănătoare celei existente înaintea apariţiei inflamaţiei. Cel mai frecvent, procesul de vindecare are loc prin intermediul dezvoltării unui ţesut de granulaţie.

GRANULOMUL ŞI CICATRIZAREA PLĂGILOR

Există, în literatura de specialitate, un număr extrem de mare de modele experimentale adecvate, pentru studiul apariţiei şi evoluţiei granuloamelor, pînă în momentul în care este restabilită normostabilitatea structurală a macromoleculelor ţesutului respectiv. În multe dintre aceste lucrări, observaţiile histochimice şi electronomicroscopice sînt asociate cu determinări biochimice, urmărindu-se astfel, etapă cu etapă, dinamica sintezei şi acumulării variatelor tipuri de mucopolizaharide, glicoproteine, proteine necolagene, ca şi a diferitelor fracţii ale colagenului. Din cauza numeroaselor deosebiri de condiţii experimentale, factori etiologici, specii etc., majoritatea rezultatelor nu sînt superpozabile. De aceea, ne vom limita să facem doar anumite exemplificări. Astfel, în granulomul indus prin administrare de carageenină, au fost evidenţiate următoarele modificări în paternul mucopolizaharidic al ţesutului de neoformaţie [882].

	a 4-a zi	*a 7-a zi*	*a 11-a zi*
Acid hialuronic (%)	87,3	90,0	73,0
Condroitin-sulfat A (%)	9,9	7,7	21,6
Heparitin-sulfat (%)	2,8	2,3	5,4

Datele menţionate indică o creştere a condroitin-sulfatului A şi a heparitin-sulfatului, cu cît granulomul devine mai matur. În alte investigaţii se menţionează creşteri ale acidului hialuronic şi condroitin-sulfatului A pînă în ziua a 5-a, urmată apoi de o scădere progresivă, în timp ce, din ziua a 3-a se notează a creştere a hidroxiprolinei [672].

Scanned with OKEN Scanner

Elaborarea maximă de colagen a fost evidențiată între zilele 6 și 11, depinzînd mai ales, de calitatea materialului utilizat pentru implante [213]. În granulomul prin implante de burete, se constată aceeași scădere de acid hialuronic după ziua a 6-a, diminuînd cu peste 50% din valorile maxime. În schimb, condroitin-sulfații cresc progresiv, fapt atestat și de încorporarea crescută de radiosulfat, demonstrată histoautoradiografic. În acest tip de granulom nu s-au evidențiat substanțe de tip heparinic [801]. Într-o plagă cutanată dorsală la șoarece, s-a demonstrat că sinteza maximă de colagen apare la 6—9 zile de la incizie, cantitatea crescînd de la 9,50 g% g de piele uscată în a 3-a zi de la incizie, la 9,87 în a 6-a zi și la 22,3, în a 9-a zi [11]. Această acumulare de colagen corespunde pe secțiunile microscopice, unei fibrilogeneze maxime și este precedată de o acumulare de material metacromatic, identificat ca mucopolizaharide de tipul condroitin-sulfaților. În granulomul prin bioxid de siliciu, nivelul cel mai ridicat al hexozaminelor și al acizilor hexuronici și ascorbic, a fost evidențiat la 4—8 zile, reflectînd faza maximă a metabolismului celular. Ulterior, apare și o sinteză importantă de colagen, în timp ce, mucopolizaharidele diminuă progresiv [255]. În granulomul prin ulei de terebentină, hexozaminele ating nivelul maxim a 5-a zi, iar colagenul în a 7-a zi, cînd apar și fibrele de neoformație [1075]. În privința dinamicii variațiilor cantitative ale diferitelor fracții ale colagenului, reproducem, pentru exemplificare, datele rezultate din studiul unui granulom la carageenină [213]:

Zile	3	5	6	7	11	13
Hidroxiprolină liberă	12,4	4,4	8,04	3,84	1,94	2,27
Hidroxiprolină în peptide	2,2	9,3	8.05	6,18	1,16	1,53
Hidroxiprolină totală		162	374	289	780	1 235
ADN	2 020	1 550	2 380	1 720	973	1 480

Cantitățile reprezintă 'µmg/100 mg de substanță uscată.

În funcție de durata cicatrizării, s-au descris granuloame cu evoluție rapidă și granuloame cu evoluție lentă. Cele cu evoluție rapidă, cum apar, de exemplu, după implantare subcutanată de fragmente de polivinil, prezintă o cantitate subnormală de colagen în primele 10 zile de dezvoltare, ca apoi valorile să crească, depășind cu aproximativ 50% pe cele din pielea normală [89]. Către ziua a 50-a valorile normale sînt din nou atinse, prin liza colagenului în exces, rămînînd însă modificat raportul dintre fracțiile solubile și cele insolubile. El este de 0,20, față de numai 0,13 în țesutul normal, sugerînd absența maturării colagenului din plagă, care favorizează, probabil, rezorbția granulomului. În granuloamele cu evoluție lentă, cum ar fi cele produse prin administrare subcutanată de ulei de terebentină, sinteza crescută de colagen poate fi evidențiată din ziua a 3-a, urmînd, apoi, o acumulare progresivă, dar discretă, care permite atingerea valorilor normale abia în a 8-a săptămînă [89].

Scanned with OKEN Scanner

Exemplele menţionate demonstrează că evoluţia ţesutului inflamator spre granulom este influenţată ca durată, intensitate şi mod de cicatrizare, de natura agentului care a provocat inflamaţia, precum şi de particularităţile morfofuncţionale şi metabolice ale ţesutului lezat; la aceşti factori se pot adăuga importanţa participării sistemului nervos şi a glandelor endocrine şi importanţa participării sistemului reticulo-histocitar,în special a elementelor „imunologic competente".

Ca factori locali, care stimulează formarea ţesutului de granulaţie cercetările noastre au atras atenţia, în primul rînd, asupra *histaminei.* Acumularea ei incită sinteza de mucopolizaharide acide în fibroblaşti, elemente reticulo-histocitare şi macrofage [678, 679, 681, 682, 1114]. Investigaţiile noastre au folosit, ca metode de creştere a cantităţii de histamină din plămînul de cobai : inhalaţii cu fum de tutun; inhalaţii cu particule de bioxid de siliciu; instilaţii intratraheale cu histamină; excitaţia electrică a vagului cervical. Toate aceste metode au determinat o mărire, de 3 — 4 ori faţă de normal, a valorilor histaminei intrapulmonare [678, 681, 682]. Aceste investigaţii au demonstrat că histamina este un factor important, nu numai în stimularea sintezei de mucopolizaharide acide, ci şi pentru evoluţia mai rapidă a întregului ţesut de granulaţie, inclusiv pentru ritmul în care se face cicatrizarea şi contracţia plăgilor. Această afirmaţie se bazează pe constatarea, că, ar exista un raport direct între capacitatea de contracţie a plăgilor şi capacitatea de sinteză histaminică a ţesutului lezat [1217]. Stimularea ritmului cicatrizării ar putea fi explicată şi prin potenţarea sintezei de colagen, sinteză ce ar creşte cu aproximativ 55% peste normal, după administrarea histaminei [933]. La nivelul focarului inflamator, acţiunea histaminei este însă mult mai complexă; prin capacitatea de a deschide aşa-zişii „pori" endoteliali, histamina favorizează acumularea de exsudat, iar, prin efectele asupra terminaţiilor nervoase, modifică motricitatea vasculară locală, alterînd astfel, mai mult sau mai puţin grav, metabolismul tisular local. Nu insistăm însă asupra acestor efecte, întrucît depăşesc subiectul prezentei monografii.

În afara histaminei, numeroşi alţi factori pot modifica modul de organizare macromoleculară a ţesutului de granulaţie. Astfel, dacă se introduc, artificial, legături încrucişate, fibrele de colagen care se formează prezintă o rezistenţă mai mare la tracţiuni şi la presiuni [839]. Dimpotrivă dacă un granulom la carageenină este tratat cu ser de reumatic, dezvoltarea apare întîrziată, iar fibrele au un grad mai redus de stabilitate structurală [480]. Factori încă neprecizaţi fac ca macromolecula de colagen din cicatricile plăgilor să posede un grad de cristalinitate mai redus decît în ţesutul normal. El este şi mai puţin net în cheloide [490]. În legătură cu acelaşi subiect, menţionăm că, în cheloid, ca şi în cicatricile mai tinere de 6 luni, există mai mult colagen neutrosolobil, decît în pielea normală (4,6 — 9,7% faţă de 1,2 — 3,2%); de asemenea, raportul monomeri alfa/dimeri beta este de 1,4 — 2,0 în cheloid şi cicatricea tînără, faţă de 0,8 — 1,2 în pielea normală, sugerînd un grad mai redus de stabilitate structurală a fibrelor. Conţinutul în apă a fost găsit de 74 —

Scanned with OKEN Scanner

80% în cheloid și cicatricea tînără, și, respectiv 59 — 69% în țesutul normal [463]. La microscopul electronic, fibrele de colagen din cheloid prezintă un diametru cu aproximativ 20% mai redus decît în pielea normală, iar, la difracția la raze X, un patern de macromoleculă mai puțin matură. Aceste modificări calitative dispar în anumite cicatrici vechi, colagenul prezentînd aceleași particularități fizico-chimice ca și în pielea normală [462].

Printre factorii care ar putea influența modul de organizare macromoleculară a granulomului, investigațiile noastre au evidențiat concentrația mucopolizaharidelor acide locale. Astfel, după instilații intratraheale cu heparină, am produs în interstițiul conjunctiv pulmonar un proces inflamator cu o evoluție particulară. Inițial, mucopolizaharidul exogen a fost total înglobat de macrofage. După aproximativ 7 zile, heparina a început să fie eliminată în interstiții și, sub această formă, a dat naștere la focare exsudative, iar, ulterior, la țesut de granulație. În a 5-a lună de experiment, plămînii și-au reluat aspectul normal. Observații similare au fost menționate și după administrare de acid hialuronic, cu o mai mică intensitate a focarelor inflamatoare și cu revenire la normal, în a 2-a lună de experiment. Astfel, atît cu heparină, cît și cu acid hialuronic, am determinat apariția de granuloame, ca în inflamațiile nespecifice. Intensitatea și aspectul evolutiv au putut fi corelate cu concentrația mucopolizaharidului acid administrat [1102. 1114. 1115. 1121]. Aceste observații pot pleda pentru acțiuni inflamatoare directe ale concentrațiilor nefiziologice de mucopolizaharide acide. În lumina acestor date s-ar putea explica și prezența de numeroase mastocite în teritorii cu aspect permanent de inflamație cronică, cum ar fi mucoasa tubului digestiv sau cea uterină. Eliminînd continuu, prin procesul de degranulare, anumite cantități de substanțe de tip heparinic, aceste celule ar putea întreține o „stare inflamatoare", adecvată proceselor fiziologice locale. În acest sens ar acționa și histamina, și serotonina, care sînt eliberate din celulă, probabil, o dată cu heparina.

Nu intrăm în discuția modului de apariție a fibrelor colagene, reticulinice și a membranelor bazale în cursul neoformării țesutului de granulație, întrucît aceste date au fost prezentate în primul capitol al monografiei. Investigațiile de pînă acum nu au adus nici un argument științific important spre a dovedi că, în cicatrizarea plăgilor, ar exista un alt mecanism de fibrilogeneză, decît cel analizat în condiții fiziologice de dezvoltare a organismului. De aceea, o ultimă, problemă asupra căreia ne vom opri este aceea a contracției plăgilor. Se admite că, două procese mai mult sau mai puțin interdependente, ar contribui la această contracție: formarea granulomului însăși, sub aspectul unui țesut conjunctiv de tip embrionar, și maturarea lui mai precoce în zonele periferice ale leziunii. Dacă se face o secțiune în piele, se poate constata, din prima sau a doua zi, că marginile plăgii au tendința să se apropie și că suprafața de secțiune are diametre din ce în ce mai mici. Aceasta ar indica, că, cel puțin în parte, mecanismul de contracție nu este subordonat apariției țesutului de granulație, întrucît acest țesut lipsește în primele zile.

Ce produce atunci această mişcare centripetă a marginilor plăgii, pe care o denumim contracţie? Cei mai mulţi autori susţin că ar fi determinată de maturarea şi retracţia fibrelor de colagen. Nu există însă dovezi concludente că acest proces de contracţie poate fi corelat cu valorile hidroxiprolinei în plaga respectivă. Nici ipotezele bazate pe reducerea de volum a protoplasmei fibroblastelor nu par suficient de bine fundamentate De aceea, sînt mereu luaţi în consideraţie factori noi, cum ar fi gradul progresiv de deshidratare a granulomului. Ar fi vorba de un proces lent, ce ia naştere prin simpla evaporare de suprafaţă. De aceea, atunci cînd această evaporare este împiedicată, diminuă şi capacitatea de contracţie a plăgilor. (1215).

Pentru ca procesul de vindecare al unei plăgi să ajungă la *restitutio ad integrum*, este necesar ca toate fibrele de colagen formate în masa ţesutului de granulaţie să fie rezorbite. Degradarea organizării macromoleculare a fibrelor începe în general la periferia plăgilor, acolo unde contracţia este mai intensă, continuîndu-se apoi în direcţie centripetă. Factorii care determină acest proces par a fi diferiţi de cei ce produc liza fibrelor de colagen în faza iniţială a inflamaţiei. Pe primul plan atrage atenţia rolul jucat de celulele pereţilor capilari. Observaţii, datînd de la începutul secolului, au atras atenţia că granulonul întîrzie să apară şi cicatrizarea se face mai greu, dacă se elimină din plagă plexul vascular, superficial. Investigaţii ulterioare au demonstrat că, în pereţii leziunii, multe capilare se termină în fund de sac şi că, de-a lungul lor, migrează celule mezenchimale nediferenţiate, care se transformă, apoi, în elemente endoteliale, se unesc prin prelungiri stelate şi alcătuiesc noi reţele capilare. Neoformaţia vasculară ar continua pînă cînd tot exsudatul, toate resturile celulare, ca şi excesul de mucopolizaharide acide, glicoproteine, proteine necolagene şi colagene au fost eliminate din focarul inflamator şi înlocuite cu ţesutul de granulaţie. Cînd acest ţesut s-a format, apare un anumit grad de devascularizare, diminuă numărul fibroblaştilor şi creşte cel al fibrelor fucsinofile şi argintofile. Procesul de devascularizare rezultă, probabil, consecutiv unei importante măriri de volum a diametrului celulelor endoteliale, care astupă lumenul, iar, ulterior, se desfac din prelungirile ce le uneau, participînd, ca elemente izolate, la formarea granulomului. Din acest moment, modul de organizare macromoleculară a ţesutului conjunctiv local este dependent de modelarea exercitată de aceste celule, prin intermediul enzimelor lizozomiale şi, probabil, al altor produşi de metabolism. Prin activităţi enzimatice de tipul hialuronidazelor, heparinazelor, sialidazelor, proteazelor nespecifice, colagenazelor etc., celulele granulomului degradează ceea ce este în exces, refăcînd organizarea structurilor ţesutului conjunctiv, aşa cum era înaintea apariţiei inflamaţiei. Studiile efectuate în acest domeniu au atras atenţia şi asupra unor aspecte particulare, legate de locul unde s-a produs plaga. Astfel, în leziunile pielii, se atribuie epidermului un rol important în liza colagenului în exces din ţesutul de granulaţie. S-au descris, chiar, imagini de migrare a elementelor epiteliale, printre fibrele conjunctive, urmate de degradarea acestor fibre.

Scanned with OKEN Scanner

In vitro, cultivarea pielii de cobai din zona unei plăgi, cu geluri de colagen, permite să se observe o importantă liză a colagenului, la aproximativ 48 de ore de la începutul culturii [427]. În alte investigații se menționează că, în culturile de țesuturi, toate fragmentele de organe ce conțin epitelii prezintă o activitate colagenolitică mult mai marcată, decît cele formate numai din țesut conjunctiv [898]. În lumina acestor observații se sugerează că plăgile care se cicatrizează cu o mare bogăție de fibre, ar reflecta insuficienta sinteză de enzime cu capacități colagenolitice, de către epiteliile adiacente. S-a mai sugerat că elementele mezenchimale ar fi stimulate să elaboreze colagenaze, dacă vin în contact cu epiteliile [427].

În cazul plăgilor chirurgicale, refacerea normostabilității structurale implică, de multe ori, și rezorbția firelor de catgut utilizate pentru sutură. Observații numeroase tind să demonstreze, că, degradarea colagenului din aceste fire este rezultatul eliberării de fermenți de către granulocitele neutrofile, care, așa cum s-a mai arătat în paginile anterioare, exercită nete acțiuni colagenolitice. Ulterior, macrofage și celule gigante înglobează complexele macromoleculare degradate, iar compușii dializabili sînt eliminați prin circulația sanguină și limfatică. La nivelul ficatului, s-a notat un aspect mai particular, caracterizat prin proliferarea fibroblastică și formarea unei capsule fibroase în jurul firelor de catgut. Ulterior, capilarele invadează această capsulă, împreună cu numeroase celule de infiltrație și, atît firele de catgut, cît și capsula conjunctivă sînt total rezorbite. Desigur, că, în interpretarea proceselor ce au loc în rezorbția catgutului, nu trebuiesc suprapuse toate datele cunoscute, privind degradarea fibrelor de colagen, întrucît colagenul din catgut este denaturat prin sterilizare și, deci, mult mai susceptibil, decît cel nedenaturat, acțiunii proteazelor nespecifice [1081].

Stadiul de hiperstabilizare structurală

În anumite condiții, determinate de natura agentului agresor, de intensitatea agresiunii și durata ei, de particularitățile morfofuncționale și metabolice ale țesutului lezat, de intervenții neadecvate ale sistemului nervos și ale glandelor endocrine, sau ale celulelor imunologic „competente", evoluția focarului inflamator nu se face spre *restitutio ad integrum*, ci spre formarea unui țesut de fibroză sau a altor tipuri de complexe macromoleculare, care rezistă mecanismelor fiziologice de degradare. Inflamația intră, astfel, într-un stadiu de convertire a normostabilității, în hiperstabilizare, în locul vindecării leziunii, apărînd un proces ireversibil cu evoluție clinică de lungă durată.

SCLEROZA POSTINFLAMATOARE

Scleroza postinflamatoare reprezintă, la ora actuală, o importantă problemă, nu numai pentru medicina internă, ci și pentru neurologie, endocrinologie, ftiziologie, otorinolaringologie, ortopedie și bolile profe-

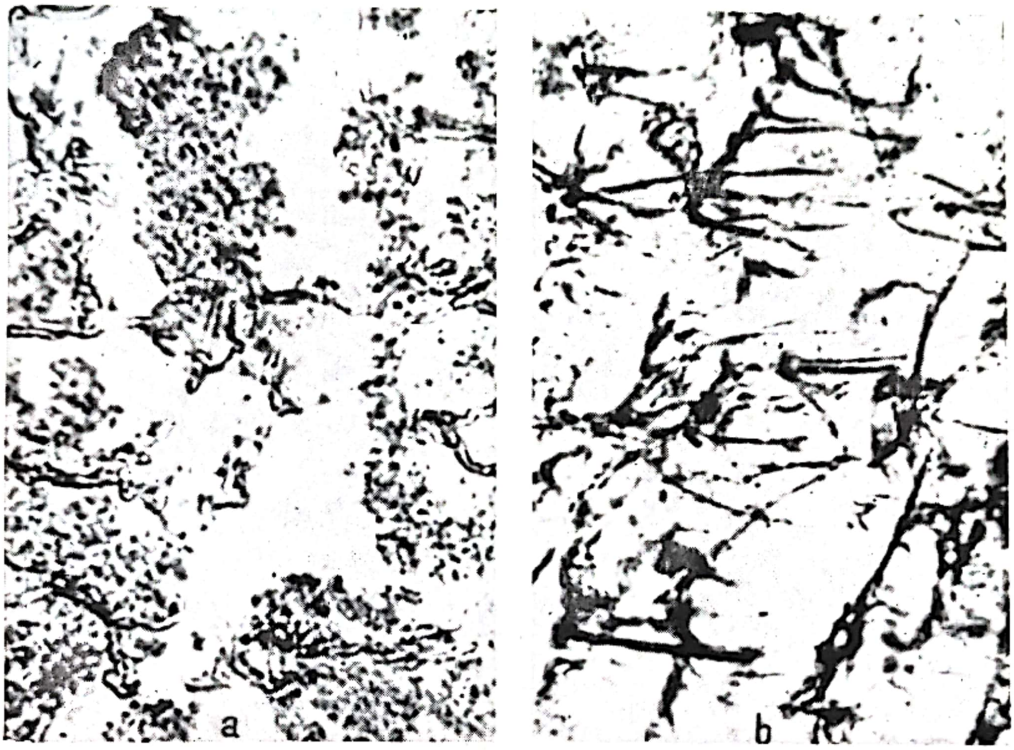


Fig. 53. Secţiune proaspătă de ficat, tratată timp de 24 de ore (a) şi 48 de ore (b) cu ser fiziologic la 37°C. a) Dispersia reţelei reticulinice şi dispariţia dispoziţiei helicoidale perisinusoidale, probabil ca urmare a dizolvării hexozaminelor. b) Dispersia reţelei reticulinice, asociată cu dispariţia parţială a argintofiliei, probabil ca urmare a dizolvării hexozelor (VELICAN C. şi VELICAN D. [1126], reprodus cu permisiunea editurii Springer).

Scanned with OKEN Scanner

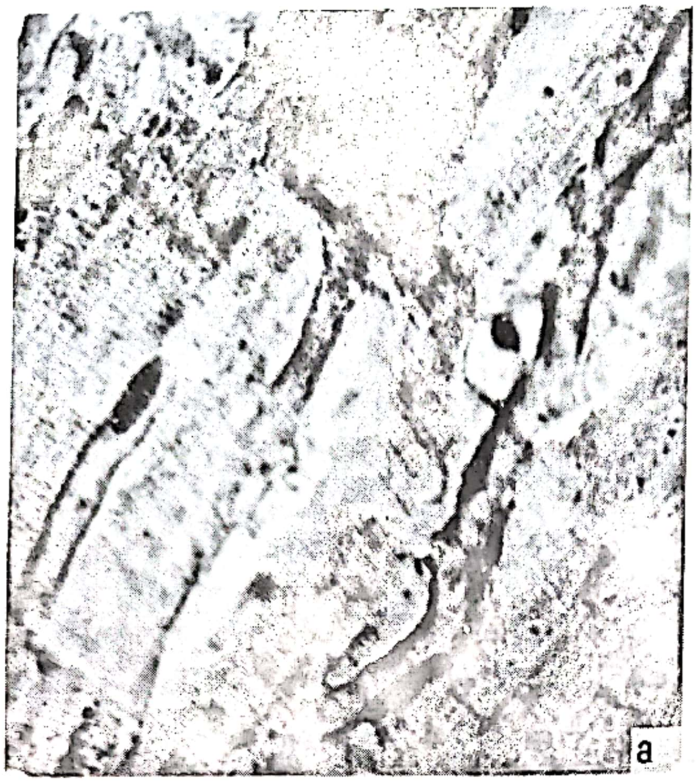


Fig. 54. a) Membrane bazale din capilarele miocardului, colorate cu PAS. b) Dispariţia substratului PAS-reactiv după digestie cu sialidază (VELICAN C. şi VELICAN D.[1131], reprodus cu permisiunea editurii Gauthier-Villars).

Scanned with OKEN Scanner

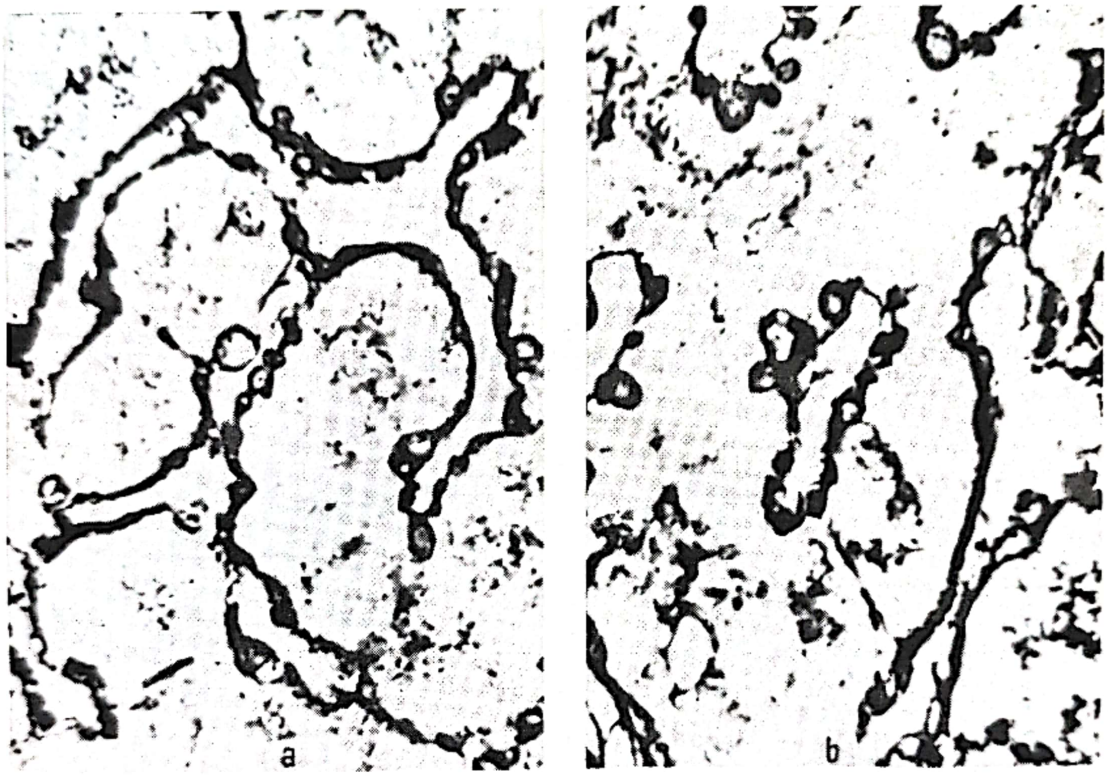


Fig. 55. Două imagini evidenţiind acelaşi proces: îngroşare progresivă a anumitor fibre reticulinice din pereţii sinusoidelor hepatice, prezentînd, pe secţiuni transversale, un centru neimpregnabil, înconjurat de o zonă intens argintofilă (VELICAN C. şi VELICAN D.[1126], reprodus cu permisiunea editurii Springer).

Scanned with OKEN Scanner

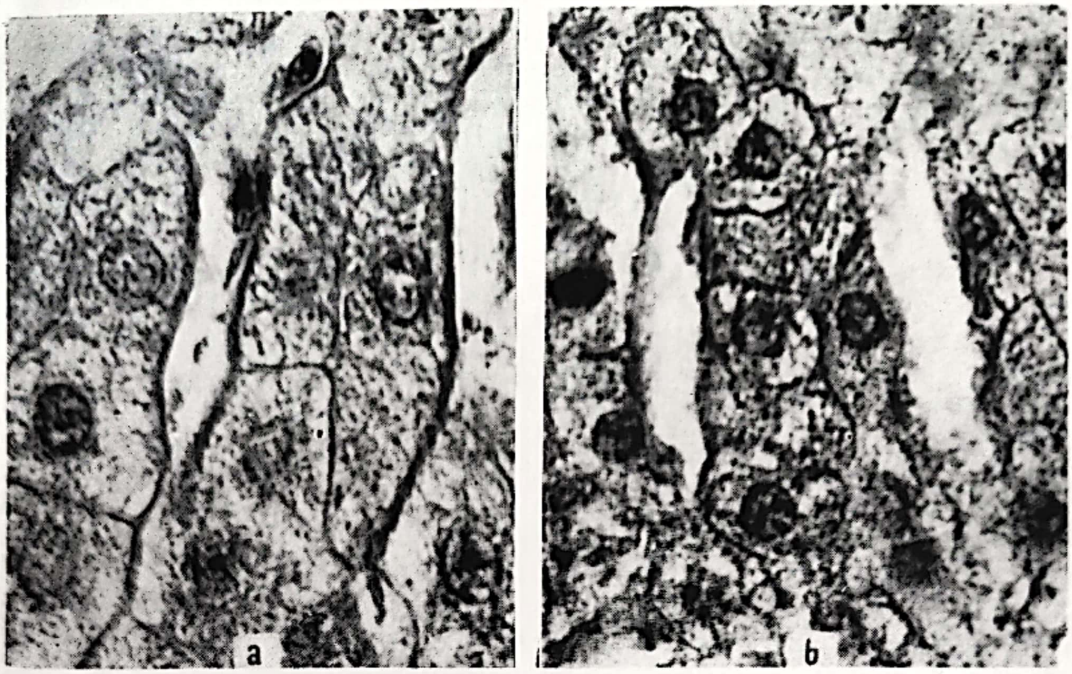


Fig. 56. a) Fucsinofilia reţelelor reticulinice din ficat, la un pacient cu hepatită cronică. b.) Dispariţia materialului fucsinofilic după digestie cu colagenază (× 880).

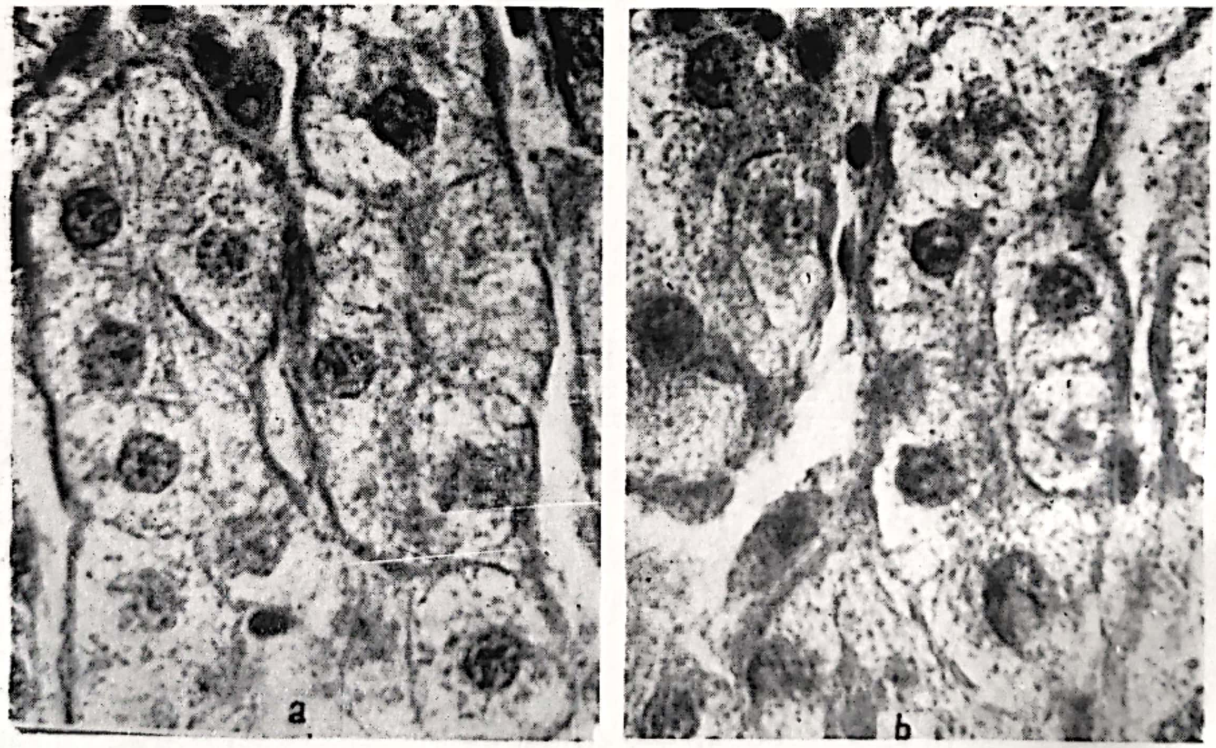


Fig. 57. a) Fucsinofilia reţelelor reticulinice din ficat la un pacient cu hepatită cronică. b) Persistenţa materialului fucsinofilic la digestia cu colagenază, dacă a fost în prealabil tratat cu acid tanic, care a introdus legături intermoleculare suplimentare (× 880).

Scanned with OKEN Scanner

sionale. De asemenea, ridică grave probleme chirurgiei generale şi numeroaselor ei specialităţi.

Cu tot impresionantul progres în arsenalul mijloacelor de investigaţie, nu putem încă preveni decît parţial modificările care apar în ţesutul conjunctiv, în intervalul de timp care separă, de exemplu, amigdalitele din copilărie de sclerozele renale ale adultului, faza acută a hepatitei virale, de cirozele ficatului, sau formele acute ale reumatismului de numeroasele manifestări cronice ale acestei boli. Este vorba de alterări care apar lent, de-a lungul unei perioade ce poate dura zeci de ani, fără manifestări clinice importante, ajungînd la o simptomatologie netă numai atunci cînd leziunile au devenit ireversibile.

De aceea, nu este surprinzător faptul că, de aproape un secol, încercările de prezentare a procesului de scleroză sînt limitate la aspecte descriptive şi la corelaţii anatomo-clinice, lipsite de suportul cunoaşterii mecanismelor patogenice [98].

Următoarele procese sînt considerate a fi potenţate în cursul apariţiei fibrozei : *a*) inducerea sedimentării precursorului globular al fibrelor de colagen ; *b*) favorizarea formării de machete, care să determine orientarea fibrilară a lanţurilor polipeptidice ; *c*) cimentarea macromoleculelor în fibrile şi a fibrilelor în fibre ; *d*) protejarea fibrilelor şi fibrelor de digestiile enzimatice care desfac macromoleculele agregate.

În condiţii fiziologice de concentraţie ionică, pH şi temperatură, macromoleculele de colagen, purificate la maximum, respectiv conţinînd o cantitate de glucide sub 0,5 %, prezintă o tendinţă spontană de a agrega în fibrile, fără nici o intervenţie a unui factor din afară. Aceste observaţii, menţionate în numeroase lucrări, sugerează că macromoleculele sînt genetic constituite pentru acest tip de agregare fibrilară. În condiţiile existenţei unui focar inflamator, atît concentraţia ionică, cît şi pH-ul pot fi modificate, existînd, în plus, variate substanţe extravazate sau elaborate de celulele în suferinţă. Fiecare din aceşti factori pot interveni în sensul grăbirii, întîrzierii sau alterării calitative a procesului normal de fibrilogeneză. În ceea ce priveşte mucopolizaharidele acide, de exemplu, s-a constatat că, în prezenţa unei substanţe fundamentale bogate în acid hialuronic şi condroitinsulfaţi, se formează fibrile cu aspect ultrastructural normal. Cînd predomină heparina, apar fibrile mai fine (cu o periodicitate de numai 220 Å în loc de 640 Å), de tipul celor existente în ţesutul conjunctiv embrionar. Ele nu au tendinţa de a agrega în fibre, ci persistă multă vreme izolate. Cînd în substanţa fundamentală predomină condroitin-sulfatul B (dermatan-sulfatul), colagenul precipită rapid în fibrile şi fibrilele în fibre, rezultînd fascicole groase, fucsinofile [563]. Glicoproteinele serice şi, în special, orosomucoidul favorizează, de asemenea, precipitarea fibrilară a colagenului, sugerînd numărul mare al agenţilor care induc o fibrilogeneză masivă într-un focar inflamator. Se pare, deci, că ar exista o corelaţie între calitatea substanţelor din interstiţii şi intensitatea procesului de fibrilogeneză. Observaţii efectuate asupra ţesutului conjunctiv embrionar, precum şi asupra granulomului tînăr, aduc argumente de necontestat, că, atîta timp cît în substanţa fundamentală predomină acidul hialuronic, nu există ten-

Scanned with OKEN Scanner

dința la formare de fibre colagene groase. Este probabil, că, acest mucopolizaharid, datorită moleculelor sale extrem de mari și omogen dispersate, precum și capacității limitate de a lega proteinele, exercită un anumit efect inhibitor asupra formării fibrelor. Dimpotrivă, condroitin-sulfatul B este mereu prezent acolo unde apar fibre fucsinofile groase, ca în valvulele cordului, pereții arterelor sclerozate, derm etc. S-a sugerat că substanțele care favorizează fibrilogeneza au o configurație sterică particulară, așezîndu-se paralel cu axul longitudinal al viitoarei fibre. Datorită grupelor electronegative, dispuse la distanțe regulat repetabile, orientate către grupele electropozitive ale colagenului, aceste substanțe acționează ca machete de precipitare fibrilară și rămîn, apoi, în fibre, ca ciment interfibrilar [1147]. În afara mucopolizaharidelor, anumite glicoproteine (convențional denumite „mucoid 2") ar acționa, de asemenea, ca ciment stabilizator interfibrilar [60]. Anumite investigații tind să demonstreze că fracții hexozice, existente în zonele de precipitare fibrilară a colagenului, pot acționa ca agenți de legătură intra— și intermoleculară, asigurînd astfel o stabilitate structurală care poate depăși limitele normalului [492], [493]. Este demonstrat, în acest sens, că dizaharidul glucoză-galactoză se conectează cu radicalul hidroxil al hidrozilizinei în proporția molară de 1 : 1 : 1, a fiecărei substanțe [184]. În alte fracții s-au identificat 7 rezidii de galactoză, pentru 5 rezidii de glucoză și o unitate de tip colagen, fiecare dintre hexoze fiind legată ca monozaharid independent [136]. Astfel, apare ca probabilă participarea unor fracții glucidice, în cantități ce depășesc limitele fiziologicului, la formarea legăturilor intra— și intermoleculare din fibrilele și fibrele de colagen, rezultînd un proces de hiperstabilizare structurală, reflectat prin apariția fibrozei. Mecanismul prin care pot fi multiplicate legăturile dintre macromolecule a fost prezentat amănunțit în capitolul al II-lea. Menționăm că ipoteza participării glucidelor (existente, la un moment dat, în focarul inflamator) la multiplicarea legăturilor încrucișate în fibrile de colagen care se formează, este susținută de diminuarea stabilității structurale a fibrelor, prin tratare cu substanțe ce elimină glucidele interconectante. În acest sens, pledează rezultatele obținute după tratare cu hidroxilamină și acid periodic [492], [493]. Analizele histochimice efectuate de noi au demonstrat, că, anumite fibre de colagen rezistente la digestia cu colagenază, devin susceptibile la această enzimă, dacă, în prealabil, s-a eliminat acidul sialic [1122], [1123]. Tot din rezultatele analizelor noastre histochimice se poate constata că, în dermul uman, fibrele colagene sărace în fracții glucidice sînt rapid degradate de colagenază ; dimpotrivă, cele care conțin un ciment stabilizator de natură mucopolizaharidică sau/și glicoproteică sînt doar parțial degradate, apărînd metacromatice și PAS-reactive, după eliminarea materialului fucsinofil [1105]. Aceste observații pot fi corelate cu ipotezele privind existența unei structuri plurifazice a fibrelor [817], [818], [1044], [1080]. Întrucît nu s-a demonstrat, pînă acum, că ar exista, în țesuturile care conțin focare inflamatoare ce evoluează spre fibroză, un tip special de macromoleculă de colagen, se acceptă ipoteza, că, factorul hotărîtor ce determină evoluția spre scleroză este reprezentat de modul de organizare macromoleculară a substanței fundamentale, în care are loc fibrilogeneza.

Scanned with OKEN Scanner

Datele prezentate aduc anumite argumente asupra rolului mucopolizaharidelor şi glicoproteinelor în exces, sau calitativ modificate, în transformarea normostabilităţii structurale a fibrelor de neoformaţie, în hiperstabilitate. Importanţa compoziţiei chimice a spaţiilor interstiţiale în care are loc fibrilogeneza, a reieşit şi din observaţiile noastre experimentale efectuate pe animale supuse la inhalaţii cronice prelungite cu fum de tutun [683]. Faţă de acelaşi factor nociv, am constatat diferenţe calitative nete în modul de adaptare a interstiţiilor organelor analizate, constatînd următoarea succesiune cronologică a acumulărilor de mucopolizaharide şi glicoproteine : acid hialuronic-condroitin sulfat A/C — substanţe heparinice-glicoproteine bogate în acid sialic, în plămîni ; acid hialuronic-glicoproteine bogate în acid sialic, în miocard ; acid hialuronic-condroitin sulfaţi A/C, în aortă. Rezultatele acestor analize histochimice au confirmat observaţii anterioare, bazate pe acţiunea diverşilor agenţi pneumoconiotici sau sclerogeni, şi anume, că, prima reacţie la noxă a interstiţiilor este acumularea de acid hialuronic. Este vorba, probabil, de o reacţie de adaptare prin intermediul unui ţesut conjunctiv de tip embrionar, cel mai permeabil, cel mai dinamic, permiţînd, cel mai uşor şi mai rapid, refacerea hemeostaziei locale. Dacă agresiunea continuă, în funcţie de particularităţile locale secretorii şi de gradul alterării permeabilităţii capilare, se acumulează condroitin-sulfaţi şi glicoproteine, începînd, într-un ritm mai mult sau mai puţin intens, procesul de fibrilogeneză.

O problemă nouă, de care trebuie să se ţină seamă în analiza mecanismelor ce duc la o fibrilogeneză exagerată, cu formarea de ţesut de scleroză, este aceea a utilizării neadecvate a colagenului, existent în rezervoarele naturale ale organismului : oase, cartilaj, derm. Anumite date experimentale sugerează, că, o mare parte a colagenului ce formează fibrele ţesutului de granulaţie, nu provine din sinteză locală, ci din liza fibrelor din matricea osoasă, cartilaginoasă sau din derm. Este posibil, ca, reutilizarea macromoleculelor de colagen să fie o cale principală de apariţie a fibrozei, mai ales a formelor denumite acelulare. Observaţii efectuate, utilizînd H_3 şi C_{-14} glicină, susţin prezenţa de colagen, din depozitele naturale, în fibrele granuloamelor experimentale [577].

„COLAGENIZAREA" RETICULINEI

În legătură cu acelaşi subiect, vom discuta **mecanismul de „colagenizare" a membrelor bazale şi fibrelor reticulinice**, proces frecvent întîlnit în inflamaţiile cronice, lent evolutive, din miocard, plămîn, ficat, splină, rinichi şi glande endocrine. Prin termenul de „colagenizare" se descrie îngroşarea reţelelor reticulinice şi a membranelor bazale, asociată cu capacitatea de a se colora în roşu cu picrofucsină Van-Gieson şi cu diminuarea impregnabilităţii la nitratul de argint. Aceste modificări au fost analizate, în investigaţiile noastre, în special pe biopsiile hepatice provenite de la bolnavi cu hepatită cronică, evoluînd spre ciroză. Microscopia electronică a evidenţiat, în ficatul de om, la nivelul spaţiului Disse, pachete

izolate de fibrile colagene, care apar accidental, numai pe anumite secțiuni. Situate între hepatocite și elementele endoteliale, ele prezintă în general un diametru de aproximativ 1 μ [236, 1165]. Coexistența fibrelor tinere, cu periodicitate de aproximativ 200 Å și a celor mature, cu periodicitate de aproximativ 640 Å, în diferitele zone ale aceleiași secțiuni, sugerează că procesul de fibrilogeneză continuă lent, toată viața [1165]. Date de biochimie au demonstrat că neoformarea de rețele reticulinice este precedată și însoțită de o creștere a valorilor hidroxiprolinei [566, 869]. În timpul dezvoltării cirozelor experimentale, cantitatea de colagen crește, ajungînd să depășească de aproximativ 3 ori valorile normale [86]. Din analizele noastre histochimice, procesul de „colagenizare" a rețelelor reticulinice rezultă dintr-o fibrilogeneză anormal stimulată și care are loc în masa glicoproteică ce constituie membrana bazală sau rețeaua reticulinică. La microscopul fotonic, acest proces este exteriorizat prin: *a*) apariția de nuclei centrali colagenici în fibrele reticulinice, secționate perpendicular pe axul lor longitudinal (*fig. 55*); *b*) afinitatea pentru picrofucsină, cînd grosimea fibrei atinge aproximativ 3 μ. Materialul neimpregnabil sau slab impregnabil din centrul fibrelor este rapid susceptibil la digestia cu colagenază (*fig. 56*), dar poate fi degradat și prin tratare cu soluții ce rup legături electrostatice și punți de hidrogen. Introducerea artificială de noi legături intermoleculare transformă acest material într-un substrat rezistent la toate metodele de extracție enzimatică (*fig. 57*) și chimică [1126]. Tot din analizele noastre histochimice rezultă că, afinitatea pentru picrofucsină devine evidentă atunci cînd există o concentrație adecvată de grupări reactive în macromoleculele de colagen, pentru a lega, probabil prin intermediul punților de hidrogen, soluția Van-Gieson. Se presupune că, în special, radicalii hidroxili ai hidroxiprolinei și hidroxilizinei ar contracta aceste legături. Acești radicali nu sînt convertibili în grupări aldehidice, sub acțiunea oxidanților folosiți în histochimie, și, de aceea, colagenul apare slab impregnabil sau neimpregnabil. La periferia nucleilor colagenici rămîne un manșon glicoprotidic intens impregnabil și care se subțiază treptat, pe măsură ce macromoleculele de colagen înlocuiesc pe cele glicoproteice. În stadiul final, toată rețeaua reticulinică este înlocuită de fibrile colagene, aglomerate în fibre. Datele menționate atestă că procesul de colagenizare a reticulinei și membranei bazale rezultă dintr-o înlocuire progresivă a unui complex macromolecular glicoprotidic, prin macromolecule de colagen precipitate în fibrile și aglomerate în fibre. De aceea, noțiunile de transformare directă a reticulinei în colagen, sau de existență a unei reticuline ca precursor al fibrilelor de colagen, sînt cu mult depășite de stadiul actual al cunoștințelor în acest domeniu.

În afara procesului de scleroză (care va fi mai amplu dezvoltat în capitolul privitor la aspectele patologice particulare), în stadiul de hiperstabilizare structurală a focarului inflamator mai pot fi evidențiate acumulări de fibrinoid, hialin și amiloid. Întrucît geneza lor este, în mare parte, legată de existența unor reacții imunologice, va fi prezentată în paginile ce urmează.

Scanned with OKEN Scanner

ALTERĂRI IMUNOLOGICE

Problemele legate de reacţiile imune ale diferitelor substanţe care intră în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv sînt mult mai complexe decît cele ridicate de reacţiile imune ale parenchimurilor. Două exemplificări sînt suficiente spre a susţine această afirmaţie. Prima se referă la faptul, că, anumite macromolecule din ţesutul conjunctiv, cum ar fi cele de colagen, sînt utilizate pentru confecţionarea de fire chirurgicale, filme pentru a împiedica formarea aderenţelor, proteze vasculare şi veziculare etc. În aceste condiţii ele trebuie să posede nu numai o absorbţie biologică standard sau un anumit grad de rezistenţă mecanică, ci să fie şi lipsite de antigenicitate. A doua exemplificare se referă la faptul, că, în ţesutul conjunctiv există teritorii, cum ar fi cartilajul, în care circulaţia sanguină este extrem de redusă, iar cea limfatică lipseşte total în anumite zone. În astfel de condiţii mucoproteina din substanţa fundamentală joacă rol de antigen „sechestrat" şi nu este recunoscută ca „self", dacă este degradată şi eliminată în circulaţia generală. Aşa se explică, de ce, după administrarea repetată de papaină, s-au obţinut, la iepuri şi la maimuţe, leziuni renale, hepatice, miocardice, vasculare şi osteo-articulare, sugerînd un anumit grad de asemănare cu cele descrise la om în aşa-zisele „boli de colagen" [450]. În serul animalelor s-au evidenţiat auto- şi izoanticorpi, iar cortizonul a avut un efect net de inhibare a dezvoltării leziunilor. De reţinut şi constatarea că această dezvoltare a continuat şi după întreruperea administrării papainei. Tot pe linia participării diferitelor substanţe constitutive ale ţesutului conjunctiv la reacţiile imune, menţionăm că, *in vitro*, acidul hialuronic şi condroitin-sulfaţii s-au dovedit importanţi agenţi stimulatori ai formării anticorpilor [14], iar mastocitele eliberează conţinutul de granule în cursul şocului peptonic, mărindu-se valorile sanguine ale heparinei şi histaminei [528].

În contrast cu marea varietate a agenţilor ce pot da naştere la reacţii imunologice, modificările care apar în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv sînt destul de limitate . Pe linie metabolică s-a notat o creştere a încorporării de radiosulfat, reflectînd o intensificare a sintezei mucopolizaharidelor acide sulfatate. Datele biochimice indică, de asemenea o intensificare a elaborării mucopolizaharidelor, raportul hexozamine solubile/hexozamine insolubile fiind găsit de 0,63 în pielea animalelor martor, de 2 în inflamaţiile nealergice şi de 4 sau 5, în inflamaţiile din cadrul proceselor de hipersensibilizare [265]. Ca aspecte morfologice convenţionale se întîlnesc :

— în fenomenul Arthus, ca şi în boala serului, aspecte de inflamaţie acută, în anumite cazuri asociate cu necroze şi acumulări de fibrinoid ;
— în reacţiile anafilactice, modificări de permeabilitate capilară, reflectate prin edem interstiţial ;
— în hipersensibilitatea de tip întîrziat, predomină acumulările de elemente limfo-reticulare, intricate cu procese granulomatoase ;
— în eliminările de homografe se produc necroze, granuloame şi fibroze ;

Scanned with OKEN Scanner

— în hiperimunizările de lungă durată sau neadecvate, apar depuneri de amiloid în vase şi interstiţii.

Alterările ţesutului conjunctiv determinate de inflamaţie au fost prezentate în subcapitolul precedent, asocierea reacţiilor imunologice determinînd doar intensificări locale ale procesului inflamator. De aceea vom limita expunerea la alte tipuri de leziuni care apar în ţesutul conjunctiv în cursul stărilor de hipersensibilizare : fibrinoidul, hialinul şi amiloidul.

Fibrinoidul

Se întîlneşte mai frecvent în cursul aşa-numitelor „boli de colagen", iar accidental, în vilozităţile placentei normale, în jurul focarelor de necroză ale ulcerului gastric, în vecinătatea leziunilor de gută sau de ateroscleroză etc. Nu se poate încă preciza dacă tot ceea ce denumim în mod convenţional „fibrinoid" se referă la acelaşi tip de alterare în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv, evidenţiat şi în derm după intoxicaţii cu iod sau cu brom, după administrarea de variaţi hormoni, după anumite tratamente medicamentoase prelungite etc. [263]. Iniţial, corelaţia dintre alterarea organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv şi apariţia fibrinoidului a fost bazată pe ipoteza extravazării fibrinogenului şi depunerii unei fibrine modificate [791]. Ulterior, s-au incriminat mucopolizaharidele substanţei fundamentale locale, care ar precipita, cu anumite proteine bazice, sub formă de complexe macromoleculare patologice [18]. Cercetările de microscopie electronică nu au evidenţiat modificări ultrastructurale ale fibrilelor de colagen în zonele cu acumulare de fibrinoid şi nici în zonele unde au loc reacţii antigen-anticorp [769].

Analizele noastre histochimice, limitate la material uman, demonstrează heterogenitatea structurală a ceea ce, convenţional, denumim fibrinoid. Se poate sugera că, în histogeneza sa, ar exista mai multe etape, în parte superpozabile trecerii de la o inflamaţie subacută spre un stadiu cronic, prin intermediul unei substanţe fundamentale „nefuncţionale". De-a lungul acestor etape, apar, mai întîi, predominanţe histochimice ale acidului hialuronic şi glicoproteinelor serice bogate în acid sialic, apoi ale condroitin-sulfaţilor, substanţelor heparinice şi ale unor proteine necolagene bogate în aminoacizi bazici. Pe cazuistica noastră, participarea mucopolizaharidelor în geneza fibrinoidului a apărut mai puţin netă în sclerodermie, în comparaţie cu lupusul eritematos diseminat şi în lupus, în comparaţie cu reumatismul cronic sau artrita reumatoidă. În aceste ultime afecţiuni, (dintre toate „bolile de colagen" investigate), am întîlnit cea mai mare acumulare de material hidrolizabil prin digestia cu hialuronidază testiculară. Abundenţa funcţiilor acide ionizate ale mucopolizaharidelor acide şi ale acidului sialic în anumite fibrinoide, explică intensa lor bazofilie sau metacromazie, iar predominanţa cantitativă a unei anumite substanţe constitutive explică scăderea intensităţii coloraţiei după digestii cu hialuronidază bacteriană, testiculară, sialidază sau papaină. O metacromazie de intensitate slabă poate fi uneori intensificată după scurte

Scanned with OKEN Scanner

digestii cu pepsină sau tripsină, sugerînd că funcţiile acide ale mucopolizaharidelor erau blocate de proteine. Metodele pentru evidenţierea tirozinei, triptofanului, cistinei şi cisteinei dau rezultate mai mult sau mai puţin nete, după cantitatea de proteine necolagene incluse în complexul macromolecular dens, aparent omogen, refringent şi eozinofil, pe care îl denumim convenţional, fibrinoid. Dar nu numai intensitatea tehnicilor de colorare a proteinelor, ci şi cele pentru mucopolizaharide şi glicoproteine, ca şi susceptibilitatea la digestii enzimatice, variază de la o zonă la alta, fiind, în general, cu atît mai nete cu cît leziunea este mai recentă.

În ceea ce priveşte histogeneza, ne găsim încă în domeniul supoziţiilor. Atrag însă în mod special atenţia rezultatele cercetărilor care au demonstrat, că, dacă se adaugă plasmei umane lipsită de euglobuline, o anumită cantitate de condromucoproteină izolată din cartilaj, se formează un complex macromolecular avînd aspectul microscopic şi particularităţile tinctoriale ale fibrinoidului. Acest aspect devine şi mai net cînd în mixtura biologică se găsesc fibrinogen şi lipoproteine. S-a sugerat, pe baza acestor constatări, că este probabil, ca, *in vivo*, depolimerizarea matricei cartilajului să ducă la eliberarea în circulaţia generală a unor produşi dializabili, care sînt legaţi în complexe macromoleculare patologice, în anumite teritorii ale ţesutului conjunctiv anterior lezate, mai ales ca urmare a conflictelor antigen-anticorp. Ulterior, complexele macromoleculare patologice sînt infiltrate de lipide şi reţin şi fibrinogenul plasmatic extravazat [25]. Unul dintre factorii cei mai activi în eliberarea condromucoproteinei sub formă de produşi dializabili s-a dovedit a fi plasmina, dar tot atît de importantă pare a fi şi acţiunea litică a extractelor de granulocite neutrofile[1220]. Extractele de limfocite s-au dovedit inactive sau,chiar, inhibă procesul de condroliză. În ceea ce priveşte efectul exercitat de anumite extracte tisulare, s-a constatat, la sinoviala de artrită reumatoidă, de exemplu, că acţiunea sa condrolitică este paralelă cu gradul infiltraţiei cu polimorfonucleare neutrofile [1220]. Nu se poate încă evalua importanţa acţiunii condrolitice care se exercită în cursul infecţiilor stafilococice, ca şi a celei exercitate de către microorganismele care elaborează activatori ai plasminogenului sanguin, transformat astfel în plasmină ; reamintim că aceasta din urmă poate determina aceeaşi condroliză intensă, ca şi extractele de granulocite neutrofile.

Deşi datele experimentale şi observaţiile anatomo-clinice sînt destul de puţin numeroase în acest domeniu, se poate sugera că leucoproteazele excesul de plasmină şi distrugerea directă a condrocitelor de către toxinele elaborate de microorganisme patogene [614], reprezintă principalele mecanisme de favorizare a apariţiei fibrinoidului.

În alte investigaţii, fibrinoidul apare alcătuit în special din macromolecule de fibrină, acest aspect fiind net, la microscopul fotonic şi electronic, în special în pereţii vaselor [981]. Observaţii similare au fost făcute la şobolanii cu hipertensiune arterială experimentală, deşi în aceste cazuri nu puteau fi incriminate nici procese imunologice, nici leziuni inflamatorii. În toate aceste leziuni, diametrul macromoleculelor din complexul subendotelial, avînd aspectul fibrinoidului, varia în jurul a 50 Å, iar fibrilele

Scanned with OKEN Scanner

aveau o periodicitate de aproximativ 230 Å, sugerînd asemănarea cu fibrinogenul precipitat intra- sau extravascular [1182]. În sprijinul rolului jucat de fibrină în histogeneza anumitor tipuri de fibrinoid, pledează şi cercetările efectuate cu ajutorul metodelor de imunfluorescenţă. Astfel, după injectarea de antiser antifibrină, leziunile de artrită reumatoidă, bogate în fibrinoid, devin intens fluorescente. Aspecte asemănătoare au fost constatate şi în lupusul eritematos diseminat, dermatomiozită, glomerulonefrita subacută şi cronică, precum şi în periarterita nodoasă [384]. De o importanţă deosebită sînt acumulările de fibrinoid în ansele glomerulare, acumulări destul de frecvent întîlnite la examenul microscopic al rinichilor de la bolnavi decedaţi cu afecţiuni extrem de variate şi considerate că ar rezulta în special din precipitarea locală a unei fibrine degradate [1002]. Experimental, intensitatea leziunilor se reduce după administrarea de heparină sau de streptokinază, ceea ce ar sugera că formarea în rinichi a complexului macromolecular patologic de aspectul fibrinoidului este mult influenţată de mecanismele de coagulare. Apare, astfel, perspectiva de a influenţa degradarea acestor complexe, prin intermediul factorilor cu acţiune fibrinolitică.

Apariţia de fibrinoid a fost obţinuă şi după injctarea intradermică de extracte din celulele ganglionilor limfatici, în prealabil dezintegrate prin ultrasonare sau supuse la îngheţări-dezgheţări repetate. În histogeneza acestor leziuni au fost incriminate atît fibrinogenul extravazat, ca urmare a modificărilor locale de permeabilitate vasculară, cît şi ARN din celulele dezintegrate ; ARN ar alcătui cu fibrinogenul un complex macromolecular patologic, apărînd la microscop sub aspectul de fibrinoid[1184]. În sfîrşit, mai menţionăm că, în special în fibrinoidul din reumatismul cardioarticular şi din lupusul eritematos diseminat, metodele de imunfluorescenţă au evidenţiat importante cantităţi de gamma-globuline [1091].

În încheierea datelor privind histogeneza fibrinoidului, dorim să facem unele precizări asupra capacităţii pe care o au granulocitele neutrofile de a favoriza formarea acestui complex macromolecular patologic şi de a-l modela după ce s-a format. În privinţa histogenezei, în afara acţiunii litice asupra matricei cartilajului, menţionată anterior, se consideră ca probabilă eliberarea locală, din protoplasma leucocitelor, a unui polimer glucidic care ar face legături anormale cu fibrinogenul extravazat, favorizînd precipitarea fibrinogenului [1068]. Polimerul glucidic ar fi reprezentat de mucopolizaharidul sulfatat, prezent în granulele polimorfonuclearelor, sugerîndu-se că o mare parte a mucopolizaharidelor fibrinoidului ar avea ca sursă aceste celule [494]. De aceea, cînd radiosulfatul este administrat în cursul injectării de endotoxină preparativă pentru producerea fenomelui Schwartzmann, izotopul este regăsit atît în trombii cu aspect de fibrinoid, cît şi în anumite granulaţii din polimorfonucleare. Factorii care produc granulopenie, cum ar fi azot-iperita, diminuă apariţia fibrinoidului format în condiţiile menţionate. În lumina acestor rezultate, ocluzia capilarelor glomerulare care apare în fenomenul Schwartzmann, pare, într-o anumită măsură, condiţionată de cuplarea mucopolizaharidelor (eliberate

Scanned with OKEN Scanner

de granulocitele neutrofile) cu fibrinogenul din sînge. Procese similare s-ar mai putea produce şi în numeroase alte afecţiuni în care sînt implicate mecanisme de hipersensibilizare.

Datele actuale privind organizarea macromoleculară a fibrinoidului demonstrează că termenul de „substanţă" fibrinoidă, folosit încă destul de frecvent în anatomia patologică, este inadecvat şi nu mai are decît o valoare convenţională. Sub aspectul fibrinoidului, respectiv al unui material dens, omogen, refringent şi intens acidofil după coloraţia cu hemalaun eozină, individualizăm variate tipuri de complexe macromoleculare patologice, cu constituţie chimică şi proprietăţi fizico-chimice extrem de variate. În histogeneza lor intervin :procese de condroliză cu eliberarea unor fracţii dializabile din condromucoproteina diferitelor cartilaje şi, în special, a celor articulare ; eliminarea din granulocitele neutrofile a unor mucopolizaharide acide sulfatate ; extravazarea şi precipitarea fibrinogenului sub forma unei fibrine modificate ; acumulări locale de gammaglobuline, lipide şi glicoproteine serice, toate aceste substanţe contractînd variate tipuri de interconectări cu constituenţii substanţei fundamentale locale, mai mult sau mai puţin modificată, ca urmare a unor reacţii antigen-anticorp. Complexul macromolecular final este dotat, de cele mai multe ori, cu un anumit grad de hiperstabilitate structurală şi de aceea, rezistă mult timp mijloacelor fiziologice de degradare.

În ceea ce priveşte existenţa de „boli fibrinoide" mai mult sau mai puţin diseminate, sau specificitatea fibrinoidului pentru anumite afecţiuni alergice sau autoimune, este greu de făcut precizări atîta timp cît noţiunea, însăşi, de fibrinoid cuprinde o sferă atît de largă de produse patologice şi un număr atît de variat de complexe macromoleculare.

În afara unei descrieri histologice elementare, păstrată prin tradiţie de mai bine de o jumătate de secol şi bazată exclusiv pe coloraţia cu hemalaun-eozină, ce altă trăsătură comună mai poate fi găsită între fibrinoidul care apare în sinovială, ca urmare a unui proces de condroliză şi cel din glomerulii renali, determinat de eliminarea unor mucopolizaharide din granulocite, care favorizează precipitarea fibrinogenului ?

Hialinul

Aceeaşi bază pur descriptivă reuneşte, sub o denumire convenţional acceptată, modificări diferite ale organizării macromoleculare în pahipleurite, glomerulii renali, celulele hipofizei, pereţii arteriolelor, nodulii silicotici etc. Pentru fiecare aspect în parte este vorba, însă, de o morfogeneză diferită, de substanţe constitutive diferite, de un mod diferit de evoluţie. De aceea, nu trebuiesc căutate mecanisme patogenice comune, ci analizată apariţia fiecărui hialin în parte. Această analiză este, însă, de cele mai multe ori, destul de greu de efectuat, mai ales datorită frecvenţei cu care se asociază aspectele de hialin cu cele de fibrinoid. Este suficient să ne referim la leziuni întîlnite la nivelul glomerulilor renali,

Scanned with OKEN Scanner

al pereţilor vasculari (şi în special al arteriolelor), al valvulelor cardiace, al sinovialelor şi pielii, leziuni pe care anatomia patologică clasică le reuneşte sub denumirea de alterări fibrinoido—hialine.

Vom insista în special asupra hialinului care apare în cursul reacţiilor imunologice, rezultînd din incrustarea structurilor conjunctive (în special a membranelor bazale şi a fibrelor) cu imunoglobuline şi alte tipuri de glicoproteine serice. Acest tip de hialin este intens PAS-reactiv şi rezistă la incubaţiile cu sialidază, lizozim, hialuronidaze, papaină, pepsină, tripsină şi colagenază, prezentînd, astfel, un grad ridicat de hiperstabilitate structurală. Acetilarea blochează reacţia PAS, întrucît principalul substrat reactiv sînt hexozele din glicoproteine. Blocarea este total reversibilă prin saponificare. Prezenţa unui mare număr de grupări hidroxil libere în hexoze explică şi intensitatea metacromaziei indusă prin sulfatare, iar absenţa mucopolizaharidelor acide explică lipsa de bazofilie sau metacromazie directă. Numai coloraţia cu albastru alcian apare uneori pozitivă, avînd ca substrat acidul sialic al glicoproteinelor. Metodele de evidenţiere a proteinelor permit să se vizualizeze, în primul rînd, o mare bogăţie de grupări amino. Dintre aminoacizi, cea mai netă apare reactivitatea tirozinei. Determinările chimice menţionează bogăţia în fracţii glucidice a hialinului şi absenţa mucopolizaharidelor acide. Fracţia glucidică apare dominată cantitativ de hexoze, în proporţie de 1,2 — 1,6% în plăcile hialine şi de 1,3% în hialinul vaselor [222]. Din fracţia hexozică glucoza reprezintă aproximativ 30%, iar galactoza aproximativ 70% [264]. Cînd hialinul este încrustat cu fibrinoid, reacţia PAS diminuă ca intensitate şi se poate evidenţia un anumit grad de bazofilie sau metacromazie, datorită înglobării de mucopolizaharide acide în complexul macromolecular al hialinului. În anumite forme de hialin s-au descris acumulări de colagen cu o precipitare fibrilară anormală, colagenul putînd ajunge să constituie pînă la 80% din masa hialinului [369]. Cu cît colagenul este mai abundent, intensitatea reacţiei PAS scade. Aşa s-ar explica pozitivitatea atît de mare a acestei coloraţii în hialinul arteriolar sau al membranelor bazale, în care nu apar acumulări de colagen. Dimpotrivă, în hialinul plăcilor silicotice aceste acumulări sînt frecvente, reacţia PAS diminuînd mult ca intensitate. S-a atras atenţia asupra compoziţiei chimice diferite a hialinului, chiar în cuprinsul unui segment vascular limitat. Astfel, într-un fragment de aortă cu ateroscleroză, hialinul superficial apare intens PAS-reactiv, iar cel profund este mult mai puţin net colorabil. În histogeneza primului tip ar interveni în special glicoproteinele serice, în cel de al doilea, fibre de colagen şi de ţesut elastic degenerate.

Aspectul electronomicroscopic al depozitelor de hialin este foarte variabil şi, în general, necaracteristic. În hialinoza arteriolelor, de exemplu, el apare ca o coalescenţă de membrane bazale [1182], iar în hialinizarea fibrelor reticulinice, sub aspectul depunerii de glicoproteine de tip globulinic [385]. In glomerulii renali, aspectul cel mai frecvent descris este o simplă îngroşare a laminei densa a membranei bazale, asociată uneori cu protruziuni în zona laminei rara.

Scanned with OKEN Scanner

Frecvenţa cu care apare hialinul în stările de hipersensibilitate prelungită au sugerat ipoteza, că, principalul mecanism histogenetic ar fi acumularea de anticorpi pe membrane bazale şi pe fibre reticulinice, devenite antigenice ca urmare a modificării paternului lor de organizare macromoleculară. La rîndul său, complexul macromolecular patologic pe care îl denumim hialin ar păstra o anumită configuraţie sterică de suprafaţă, adecvată proceselor imunologice, favorizînd, în continuare, evoluţia alterărilor tisulare. Prin acest mecanism s-ar putea explica, cel puţin în parte, dezvoltarea insidioasă a aşa-ziselor scleroze „acelulare", care apar progresiv, pe arhitectura preexistentă a membranelor bazale şi a fibrelor reticulinice din variate ţesuturi şi organe. Tot prin acest mecanism s-ar putea explica anumite procese de scleroză ce apar în cursul senescenţei, bătrîneţea fiind însoţită de o accentuare a proceselor de histoincompatibilitate.

Amiloidul

Amiloidul reprezintă cea mai gravă alterare a organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv din cursul proceselor imunologice prelungite şi neadecvate. Reamintim pentru exemplificare, că reprezintă cauza principală a mortalităţii pacienţilor cu artrită reumatoidă, fiind depistat în această afecţiune cu o frecvenţă pînă la 60% [1063]. Artritele evoluînd cu simptomatologie clinică manifestă cu cel puţin 2 ani înaintea descoperirii amiloidului, au avut o durată ulterioară a supravieţuirii între 5 şi 9 ani [227].

Frecvenţa atît de mare a amiloidozei şi gravitatea tulburărilor clinice detrminate de această alterare în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv, fac necesare teste de evidenţiere a leziunilor în stadii cît mai incipiente de acumulare a amiloidului. În acest sens pot fi utile, mai ales în perioadele fără simptomatologie clinică netă, biopsiile hepatice, rectale, renale, ganglionare etc. În plus, ele pot sugera şi noi conduite terapeutice, întrucît tratamentele cu cortizon, ACTH, azotiperită sau raze X agravează adesea evoluţia amiloidozei. De un anumit interes este şi proba cu roşu de Congo : dacă peste 60% din cantitatea injectată rămîne în ser, se poate afirma absenţa unor acumulări importante de amiloid. Dacă se detectează în ser doar 41-60% din cantitatea de colorant administrată, testul trebuie considerat neconcludent şi repetat după cîteva luni. Persistenţa în ser a numai 21—40% indică probabilitatea existenţei depozitelor de amiloid, iar sub 20%, certitudinea prezenţei lor [227]. Evidenţierea de amiloidoze secundare în agammaglobulinemii a demonstrat că, în determinarea apariţiei leziunilor nu sînt absolut necesare stări de hipersensibilitate cu hiperglobulinemie, sugerînd existenţa şi a altor mecanisme care alterează organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv [1062]. Observaţii menţionînd apariţia de amiloidoze la pacienţi cu un deficit de anticorpi decelat cu mai mulţi ani înaintea acumulării amiloidului, pledează de asemenea, pentru afirmaţia

Scanned with OKEN Scanner

de mai sus. Pe de altă parte s-au strîns, în cursul ultimului deceniu, date tot mai numeroase asupra depunerilor de amiloid la bătrîni, fără să existe în antecedente stări de hipersensibilitate, prelungite sau neadecvate. În acest sens sînt de luat în considerare amiloidoza meningiană şi a vaselor cerebrale, ca şi depozitele întîlnite în creier sub formă de plăci senile sau de acumulări intraneuronale, leziuni ce ar putea constitui un substrat morfologic important în mecanismul etiopatogenic al demenţei senile şi al bolii Alzheimer [979]. La nivelul cordului la bătrîni, se pot individualiza atît acumulări intrafibrilare, cît şi interstiţiale iar pe ramurile coronarelor se văd depuneri multinodulare, în parte cu caracter stenozant. Aorta bătrînilor apare ca unul dintre organele cel mai des afectate. Deosebit de importante pentru clinică par a fi acumulările din pancreasul endocrin, sugerîndu-se că ar exista o interrelaţie între amiloidoza senilă şi diabetul senil, amîndouă fiind cele mai frecvente alterări metabolice ale vîrstei înaintate. Se consideră prezenţa simultană a amiloidozei cerebrale, cardio-vasculare şi pancreatice, ca o triadă caracteristică senilităţii [979].

Dintre toate ipotezele privind originea amiloidului, cea mai mult discutată este aceea a unei sinteze neadecvate de glicoproteine elaborate de către celulele reticulo-histocitare [1061].

Se susţine că această sinteză ar putea fi vizualizată prin utilizarea reacţiei PAS, care evidenţiază funcţiile alcool, situate în poziţii vicinale, ale fracţiilor glucidice. Produsul celular apare sub forma unor granule izolate sau confluente ; anterior însă acestei elaborări, celulele trec printr-o perioadă de pironinofilie accentuată, exteriorizînd dezvoltarea considerabilă a aparatului ribozomal şi ergastoplasmic [1061]. Particularităţile fizico-chimice şi biologice ale agentului nociv par a fi indiferente în determinarea apariţiei acestui proces de sinteză. Acelaşi aspect poate fi vizualizat, atît la om după infecţii virotice, după acţiunea toxinelor bacteriene, după stări de hiperimunizare sau după tratamente medicamentoase prelungite, cît şi la animalele de laborator supuse la cele mai variate condiţii experimentale pentru producerea amiloidozei. Studii de microscopie electronică sugerează că glicoproteina anormală se acumulează mai întîi în canaliculele dilatate ale aparatului Golgi şi reticulului endoplasmic, fiind apoi eliminată la exterior sub forma unor vacuole ce se deplasează spre periferia celulei, realizînd un proces de pinocitoză „inversată". După ce conţinutul vacuolelor este eliminat în spaţiile intercelulare, ar apare precipitarea fibrilară a produsului elaborat, constituind imaginea, caracteristică la microscopul electronic, de fibrilă de amiloid. Astfel, se trece la a doua fază din histogeneza amiloidului, faza de depozitare, caracterizată atît prin acumularea interstiţială, cît şi prin circulaţia în întregul organism a produsului anormal elaborat de celulele reticulo-histiocitare. Acumularea interstiţială duce la apariţia aspectului clasic de material omogen şi anhist, depus în jurul vaselor mici şi între celule. La periferia aglomerărilor amiloidice se pot întîlni celule hipertrofiate, intens pironinofile sau/şi PAS-reactive, implicate în procesul de sinteză. Din prezentarea ipotezei existenţei a două faze în histogeneza

Scanned with OKEN Scanner

amiloidului, se poate sugera că momentul cel mai important în mecanismul patogenic este inhibarea funcţiei de sinteză a proteinelor în anumite celule reticulo-histiocitare anterior stimulate, pe această linie de sinteză, timp mai mult sau mai puţin îndelungat. Stimularea poate fi rezultatul existenţei unor infecţii repetate care provoacă variate reacţii celulare, unele dintre ele evoluînd spre răspunsuri imunologice neadecvate sau incompetente. La aceasta s-ar putea adăuga acţiunea de inhibare a elementelor reticulo-histiocitare exercitată de agenţi terapeutici, (spre exemplu, cortizon sau azot-iperită) şi care, diminuînd sinteza de proteine, în general şi de anticorpi, în special, pot creia condiţiile dirijării sintezelor celulare spre elaborarea unor produşi anormali, de tipul amiloidului.

Nu dispunem încă de metode de laborator apte să depisteze o amiloidoză în faza de sinteză neadecvată, ci numai după ce au început acumulările interstiţiale. Acumulările apar uneori la microscopul electronic pe preparate considerate „normale" la microscopul fotonic, după colorаţii cu metodele convenţionale. De aceea, în toate cazurile cînd suspectăm o amiloidoză incipientă, se impune necesitatea examinării biopsiilor la microscopul electronic. Imaginea cea mai frecvent întîlnită este a unor fibrile aglomerate în reţele, avînd diametre ce variază între 75 şi 100 Å, după autori şi metodele de fixare utilizate. Fibrilele sînt orientate două cîte două, prezintă uneori periodicităţi transversale şi nu apar modificate după digestii cu hialuronidază testiculară sau colagenază [228]. Lungimea lor este greu de precizat, nedepăşind în general 1 μ. Se constată însă că filamentele sau fibrilele nu au tendinţa de aglomerare în fibre, ci rămîn la un stadiu inferior de agregare macromoleculară, faţă de cea a colagenului. Filamentele nu par a fi omogen constituite, ci dau impresia că sînt formate din două subfilamente, aşezate sub formă helicoidală şi conţinînd între ele o substanţă cu densitate mai redusă decît filamentele însăşi. Analize amănunţite au permis evidenţierea şi a unor cupluri de benzi întunecoase (30 Å) şi luminoase (25 Å), realizînd periodicităţi la distanţe de aproximativ 55 Å [731]. În alte investigaţii se menţionează existenţa de particule, cu formă de bastonaş lat de aproximativ 100 Å, cu aspect pentagonal şi cu un diametru, pe secţiune transversală, de aproximativ 90 Å, considerate că ar reprezenta unitatea structurală a amiloidului. Unitatea ar fi alcătuită din cinci fracţii globulare înconjurînd un centru mai dens, sugerînd că bastonaşele de amiloid sînt structuri cu un lumen în jurul căruia se dispun fracţiile globulare. Din agregarea bastonaşelor ar rezulta filamentele şi fibrilele. Procesul de agregare ar implica gruparea bastonaşelor în perechi, cu un spaţiu între ele de aproximativ 25 Å. În lumina acestor analize ultrastructurale, filamentele de amiloid apar din asocierea liniară a unor macromolecule globulare, dispuse în jurul unui lumen, imagine ce a fost asemănată cu aspectul electronomicroscopic al anumitor virusuri [133]. În mod inevitabil, rezultatele menţionate au ridicat întrebarea dacă ne găsim în prezenţa unei proteine sau glicoproteine *virus-like*, sau a unui virus însăşi? Existenţa unui lumen central în filamentele de amiloid a fost menţionată şi în alte investigaţii electronomicroscopice [101], diametrul lumenului fiind însă mai

Scanned with OKEN Scanner

mare, între 35 şi 40 Å, la autorii menţionaţi şi tot de aproximativ 25 Å, în rezultatele altor cercetători [303]. În afara constanţei lumenului, se mai remarcă constanţa descrierii unei periodicităţi a filamentelor între 40 şi 55 Å, tendinţa de grupare în perechi a fibrilelor, dispoziţia helicoidală a elementelor constitutive. Procesul de aglomerare a unităţilor globulare în filamente a apărut cu atît mai rapid cu cît pH-ul local, din jurul celulei sintetizante, era mai coborît. Cînd în jurul celulei existau factori locali de inhibare a aglomerării fibrilare, produşii globulari treceau în circulaţia generală sub formă de constituenţi serici ai fracţiei alfa-globulinice [226]. Dacă unităţile globulare sînt extrase în mediu alcalin şi apoi acest mediu este treptat acidifiat, ele au tendinţa progresivă de a forma filamente cu toate caracteristicile electronomicroscopice menţionate [387].

Problema dacă sub denumirea de amiloid definim o glicoproteină anormală sau o scleroproteină anormală, este încă discutată. Metodele cele mai perfecţionate au reuşit să reducă fracţia glucidică a amiloidului la numai 2,7% din greutatea uscată [226], hexozamina reprezentînd 1,5% din totalul acestei fracţii. În ceea ce priveşte mucopolizaharidele acide, ele variază în cantităţi de la 0 la peste 10%, de la autor la autor şi de la un amiloid la altul, evidenţiindu-se toate tipurile cunoscute : substanţe heparinice, condroitin-sulfaţi, acid hialuronic şi chiar keratosulfat. Se insistă în special asupra acumulărilor anormale de heparitin-sulfat constatate în organele cu depuneri de amiloid, acumulări care nu au mai fost evidenţiate, în alte afecţiuni, ceea ce ar arăta că nu este vorba de o impurificare accidentală a ţesutului analizat. Frecvenţa cu care este întîlnit heparitin-sulfatul, în special în amiloidoza secundară şi experimentală, în comparaţie cu alte tipuri de mucopolizaharide acide, a sugerat ipoteza fie a unei sinteze exagerate, fie a unei blocări a epimerizării glucozaminei în galactozamină. Cu toată marea abundenţă de mucopolizaharide acide în ţesuturile cu depuneri de amiloid, în fibrilele purificate aceste substanţe nu depăşesc cantitatea de 0,37 g la 100 de g de fibrile de amiloid uscate [226]. Aceste rezultate ar sugera că există mai multe alterări asociate în histogeneza amiloidozei, reflectate de sinteza şi acumularea unor glico- sau scleroproteine anormale, de modificarea cantitativă şi calitativă a paternului mucopolizaharidelor acide locale, de gradul diferit de stabilitate structurală a fibrelor ţesutului conjunctiv etc. Este interesant de reţinut, din acest punct de vedere, observaţia că, deşi electronomicroscopic toate filamentele de amiloid au acelaşi aspect ultrastructural, indiferent de organ, ţesut sau agent etiologic, în substanţa fundamentală în care se acumulează amiloidul predomină heparitin-sulfatul şi condroitin-sulfatul B în amiloidozele secundare şi acidul hialuronic în amiloidozele primare [250]. De aceea, în amiloidoza secundară miocardică întîlnim substanţe metacromatice rezistente la digestiile cu hialuronidază, iar în amiloidoza primară a miocardului, apar acumulări de material cromotrop, rapid digerat atît de hialuronidaza bacteriană, cît şi de cea testiculară.

Cercetarea ultrastructurii fibrilelor de amiloid la un nivel tehnic care să permită evidenţierea elementelor globulare constitutive, aşa cum

Scanned with OKEN Scanner

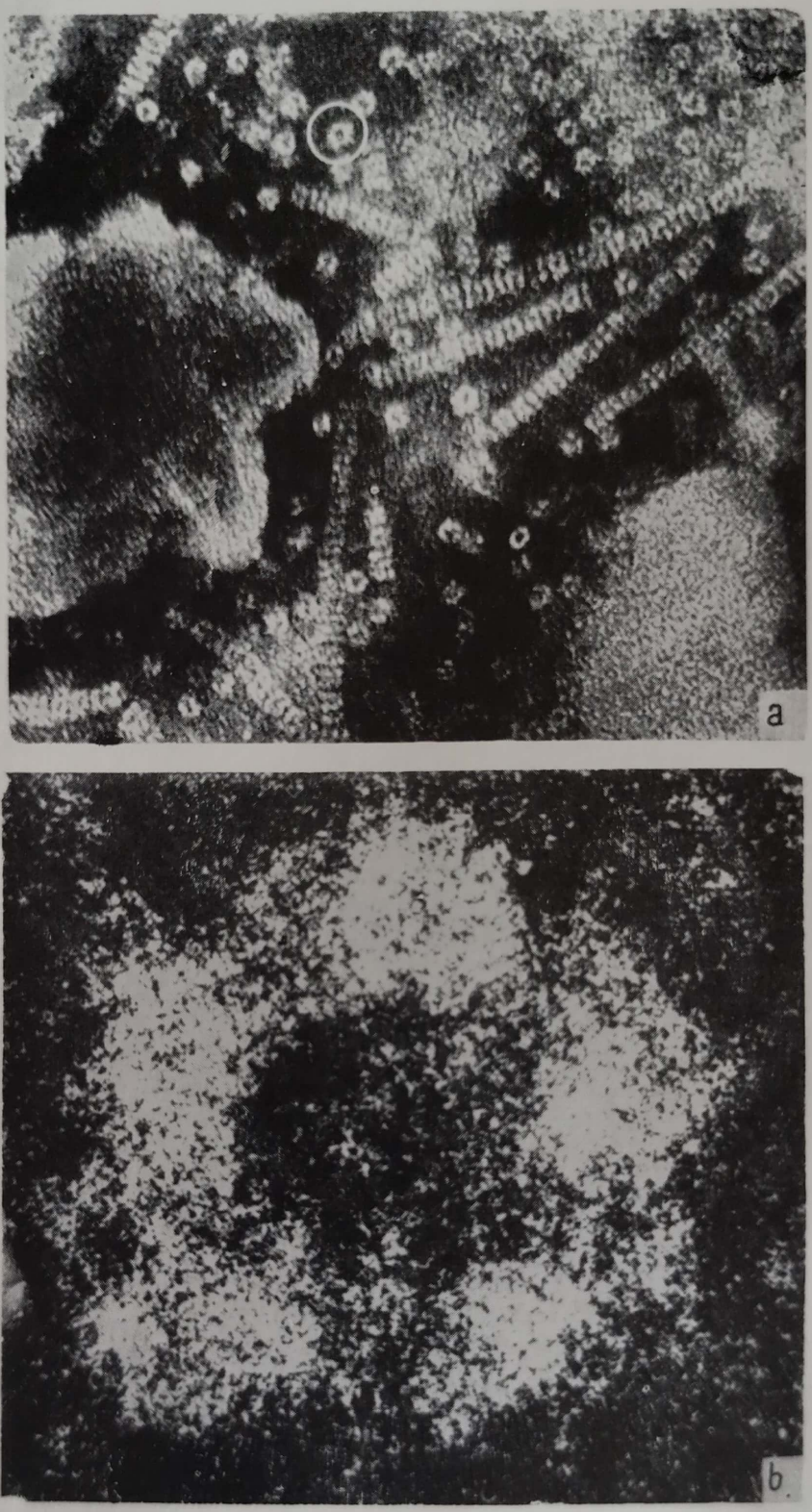


Fig. *58*. Coloraţie negativă a amiloidului din splina de om. a) Fibrile cu striaţiuni avînd diametrul de 105 Å şi lungimi variabile. În cerc este delimitată o unitate structurală, secţionată transversal, avînd un diametru de 85—90 Å şi un centru mai dens (× 516 000). b) Unitatea structurală alcătuită din cinci subunităţi de formă pentagonală (× 15 000 000); (BLADEN, NYLEN şi GLENNER [133], reprodus cu permisiunea editurii Academic Press).

Scanned with OKEN Scanner

apare în *fig. 58* nu este încă la îndemîna decît a unui număr limitat de laboratoare. În mod obişnuit, ne folosim de metode histochimice care semnalează prezenţa primelor acumulări intratisulare într-un stadiu, de multe ori, în parte reversibil. La om, depozitele de amiloid dau reacţii pozitive la coloraţiile cu roşu de Congo, cristal violet, albastru alcian, fier coloidal, PAS, ninhidrin Schiff, sugerînd prezenţa, în complexul macromolecular, de mucopolizaharide acide, acid sialic, glicoproteine şi proteine necolagene. Metacromazia directă se intensifică după digestie cu tripsină şi pepsină, indicînd că grupările carboxil şi sulfat ale mucopolizaharidelor sînt de multe ori blocate de grupările amino ale proteinelor. Rezultatele mulţumitoare obţinute şi cu metacromazia forţată, pledează pentru aceiaşi constatare. Ea este, de asemenea, susţinută prin investigarea C.E.C. (critical electrolyte concentration), metodă ce permite să se demonstreze că polianionii de amiloid sînt mascaţi, din punctul de vedere al reactivităţii histochimice, de către un surplus de proteine bogate în grupări bazice [770]. Mucopolizaharidele acide blocate de proteine şi deblocate prin hidroliza proteazelor, apar susceptibile la digestii cu hialuronidază testiculară, indicînd că sînt alcătuite din acid hialuronic şi condroitinsulfaţii A şi/sau C. Metacromazia directă este reversibilă după metilare şi saponificare, sugerînd importanţa grupărilor carboxilice în reactivitatea histochimică a substratului investigat. În ceea ce priveşte coloraţia cu albastru alcian, ea evidenţiază un material susceptibil la digestia cu sialidază. Date amănunţite asupra acestor tehnici au fost prezentate de noi într-o monografie recentă [1131]. Reacţiile histochimice pentru proteine sînt pozitive pentru grupele amino ale tirozinei şi triptofanului, negative sau dubioase pentru grupările sulfhidril şi slab pozitive pentru cele disulfidice. Un component destul de constant evidenţiat în amiloid este şi fibrinogenul, vizualizat mai ales prin metode bazate pe fluorescenţă. Cantitatea lui în amiloid a fost găsită paralelă cu concentraţia în ser. Aceste observaţii au sugerat ipoteza că amiloidoza ar avea la bază şi o modificare a mecanismelor de coagulare, rezultînd mai întîi o precipitare interstiţială a unui fibrinogen alterat şi, ulterior, reţinerea în ochiurile reţelei de fibrinogen a unităţilor circulante ale amiloidului. Pe baza aceleiaşi ipoteze s-a sugerat că o parte din fibrilele considerate a fi amiloid nu reprezintă decît fibrinogen, parţial sau anormal polimerizat [496]. Alte analize chimice au demonstrat existenţa în amiloid a unor proteine globulare, cu greutate moleculară de aproximativ 13 500 şi cu un patern de aminoacizi caracterizat prin absenţa treoninei, cistinei şi cisteinei. S-a sugerat că această proteină ar putea reprezenta : a) o fracţie proteică a unui virus ; b) un produs normal de sinteză, elaborat în cantităţi anormal de mari în condiţiile care determină apariţia amiloidozei ; c) un produs anormal de sinteză, eliminat de celule cu un anumit defect genetic sau alterate funcţional prin *stress*-uri repetate şi prelungite ; d) un pool proteic rezultînd din absenţa conectării lanţurilor polipeptidice cu anumite mucopolizaharide, sub aspectul complexelor macromoleculare mucoprotidice [101]. Ultima ipoteză a fost cea mai adînc analizată, pe linia unui defect de legătură mucopolizaharido-polipeptidică, a represiunii sintezei de proteine

Scanned with OKEN Scanner

sau a unei sinteze alterate a fracţiei proteice a mucoproteinelor [251]. Faptul că, după ce s-au injectat la iepure fibrile izolate de amiloid au apărut anticorpi faţă de anumite proteine plasmatice, a sugerat ideea participării şi a acestor proteine în geneza amiloidului. Este vorba în special de imunoglobuline gamma A, gamma G, de fibrinogen, de o proteină cu mobilitatea electroforetică a globulinei beta şi de o proteină cu mobilitatea electroforetică a globulinei alfa, [200]. Menţionăm, de asemenea, că s-au izolat din depozitele de amiloid două fracţii glicoprotidice, una dominată de bogăţia în hexoze, cea de a doua de bogăţia în acid sialic [793]. Toate aceste date subliniază cît de complex este materialul biologic căruia i se atribuie denumirea de amiloid, reflectînd prin această complexitate structurală, numeroasele şi variatele mecanisme patogenice ce stau la baza apariţiei lui.

Pentru interpretarea mecanismului coloraţiilor de rutină care evidenţiază amiloidul, menţionăm că afinitatea pentru roşul de Congo este considerată că ar rezulta din formarea de punţi de hidrogen între colorant şi fracţiile glucidice ale complexului macromolecular patologic [884]. Tot fracţiilor glucidice se adresează şi coloraţia cu iod.

Faptul că majoritatea metodelor histochimice de evidenţiere a amiloidului se bazează pe reactivitatea componentelor glucidice, a sugerat ipoteza că în acest complex macromolecular patologic ar exista hidraţi de carbon anormali, care interferează cu reactivitatea componentelor glucidice normale. Ar fi vorba, în special, de substanţe asemănătoare celulozei sau hemicelulozei care ar prezenta o mare afinitate pentru iod şi roşul de Congo, apărînd şi birefringente [33]. În lumina acestei ipoteze, alterarea metabolică în celulele anormal sau neadecvat stimulate, s-ar răsfrînge nu numai asupra sintezei de proteine, ci şi de fracţii glucidice.

Corelat cu aceste date, nu putem să trecem cu vederea faptul că acumularea de amiloid prezintă şi anumite preferinţe „imunologice". Ea este foarte netă şi frecventă în organe bogate în ţesut reticulo-histiocitar şi reţele reticulinice, sugerîndu-se chiar că alterarea acestor reţele le-ar transforma în zone antigenice care atrag macromoleculele de amiloid ca pe nişte anticorpi. Totuşi, această ipoteză nu explică mulţumitor de ce amiloidul se acumulează atît de des în organele sărace în celule reticulo-histiocitare şi fibre reticulinice, cum ar fi tecile nervilor, spaţiile perivasculare etc. Nu trebuie trecut cu vederea nici faptul că în organism există teritorii unde în mod obişnuit sînt depozitate anumite substanţe vehiculate de sîngele circulant. Exemplul mezangiului glomerulului renal este extrem de demonstrativ din acest punct de vedere.

În încheierea acestor date subliniem că, în afara particularităţilor electronomicroscopice, biochimice, fizico-chimice şi histochimice ale fiecărui depozit în parte, experienţa noastră ne-a permis să constatăm că o anumită importanţă în interpretarea rezultatelor trebuie acordată şi vîrstei leziunii, modificărilor perilezionale, particularităţilor topografice ale organului respectiv şi particularităţilor bolii dominante. Astfel, în amiloidoza care apare în cursul evoluţiei unui mielom multiplu, evidenţierea histochimică a mucopolizaharidelor a apărut constant mai netă,

Scanned with OKEN Scanner

decît în amiloidoza din supurațiile cronice. Tot în mielomul multiplu, blocarea reacției PAS prin acetilare a apărut incompletă, în timp ce în supurațiile cronice însoțite de amiloid era totală. Am mai constatat că atît reacția PAS, cît și colorația cu violet de crezil au fost mai intense în amiloidozele primare, în comparație cu cele secundare. De asemenea, reacția PAS a apărut mai netă în amiloidul din sarcoidoză și din boala Hodgkin, în comparație cu cel din tuberculoză; metodele de evidențiere a mucopolizaharidelor acide au fost mai constante ca rezultate în tuberculoză, în comparația cu boala Hodgkin; cea mai intensă colorație cu albastru alcian și susceptibilitatea cea mai marcată la sialidază, a prezentat-o amiloidul din glomerulii renali și din fibroadenomele glandei mamare. În afara acestor particularități legate de organ, boală și evoluția clinică, o serie de aspecte particulare pot rezulta din metodologia utilizată. Astfel un amiloid slab colorabil cu albastru alcian devine intens albastru dacă se ridică pH-ul soluției colorante de la 2,6 la 5,7. De aceea, rezultatele diferitelor investigații reflectă condițiile de lucru respective și nu trebuie generalizate decît cu multă prudență.

Cu toate aceste rezerve, subliniem încă odată importanța biopsiei ca mijloc de evidențiere precoce a amiloidului și de instituire a unui tratament adecvat. Ori de cîte ori se constată pe biopsii prezența de celule reticulo-histiocitare cu protoplasmă pironinofilă sau PAS-pozitivă și cu diametrele celulare mult mărite, trebuie să căutăm cu răbdare și perseverență începutul formării primelor depozite de amiloid. Investigații de acest fel, efectuate în cursul ultimilor ani în laboratorul nostru, ne-au demonstrat cît de ușor pot scăpa observației microscopice aceste depozite minuscule, prezente de multe ori la bolnavi fără nici o afecțiune clinică ce ar putea ridica problema asocierii cu o amiloidoză. De un interes deosebit din acest punct de vedere s-a bucurat, în cursul ultimilor ani, biopsia de mucoasă rectală[1018], dar toate tipurile de biopsii pot contribui la diagnosticul precoce al amiloidozei.

Rolul macromoleculelor constitutive ale țesutului conjunctiv, în apariția proceselor imunologice

Participarea țesutului conjunctiv la reacții imunologice este mult mai complexă decît simpla formare în interstiții a unor agregate macromoleculare patologice. Cercetările efectuate în cursul ultimelor două decenii au adus dovezi tot mai concludente că însăși substanțele constitutive ale complexelor macromoleculare ale țesutului conjunctiv pot deveni antigenice, determinînd apariția a variate procese patologice, ca urmare a stimulării producerii atît de hetero-, cît și de homoanticorpi. Nu toate investigațiile în acest domeniu s-au terminat cu rezultate satisfăcătoare, întru cît metodologia actuală este departe de a satisface exigențele cercetătorilor. Într-adevăr, metodele chimice de extracție, uneori foarte brutale,

Scanned with OKEN Scanner

denaturează atît paternul de organizare macromoleculară a ţesutului conjunctiv în general, cît şi al fiecărui constituent în particular, creînd uneori false antigenicităţi, sau făcîndu-le să dispară pe cele naturale. Pe de altă parte, de multe ori nu s-au putut stabili corelaţii între nivelul anticorpilor circulanţi şi intensitatea leziunilor din ţesutul conjunctiv, fie datorită faptului că o mare parte a anticorpilor pot fi adsorbiţi pe ţesut, fie că sînt elaboraţi în exces numai în zonele bogate în antigene, fără să existe o reflectare a elaborării şi în circulaţia generală.

Dintre substanţele capabile să dea naştere la reacţii imunologice, cea mai mult studiată a fost colagenul. Utilizarea lui atît de largă în industria chimico-farmaceutică a impus o cunoaştere cît mai adîncă a capacităţilor acestei macromolecule de a deveni antigenică şi a modalităţilor de a împiedica apariţia acestei antigenicităţi. S-a menţionat în primul capitol că în structura macromoleculei de colagen se pot individualiza zone cristaline, alcătuite din aminoacizi apolari, situate în special în regiunea centrală a triplului helix, şi zone amorfe, alcătuite din aminoacizi polari, situate în special la periferia triplului helix. Întru cît antigenicitatea colagenului diferă foarte mult de la o specie la alta şi întru cît zona cristalină dominată de secvenţa glicină-prolină-hidroxiprolină a fost constant întîlnită la toate speciile investigate, s-a dedus că antigenicitatea ar rezulta dintr-un mod particular de alcătuire a lanţurilor polipeptidice terminale. În special bogăţia în tirozină a acestor lanţuri a putut fi corelată cu capacitatea de a stimula apariţia de anticorpi[984]. Numeroase alte constatări vin în sprijinul acestei ipoteze; dintre ele menţionăm diminuarea capacităţii antigenice după digestii cu enzime proteolitice nespecifice, care atacă selectiv zonele terminale ale macromoleculei de colagen. Consecutiv acestei digestii, paternul caracteristic la difracţie cu raze X a macromoleculei nu pare alterat, ceea ce constituie un argument în plus că dispariţia antigenicităţii poate fi corelată cu degradarea lanţurilor polipeptidice terminale bogate în aminoacizi polari[966]. Astfel, cel puţin pe baza datelor obţinute pînă acum, prin analiza colagenului nedenaturat, antigenicitatea macromoleculei de colagen pare legată, în primul rînd, de zonele amorfe situate în afara triplului helix. Dacă însă se formează peptide sintetice cu secvenţa prolină-prolină-glicină, sau prolină-prolină-glicină-hidroxiprolină şi se injectează la cobai, ele produc anticorpi specifici pentru fiecare secvenţă în parte[163]. În sprijinul ipotezei că şi zona cristalină a macromoleculei de colagen ar putea, în anumite condiţii, să devină antigenică, se aduc şi dovezile indirecte că anumite macromolecule de colagen îşi pierd capacitatea de a stimula formarea de anticorpi după digestie cu pepsină, iar altele după digestie cu colagenază[1029]. Pe măsură ce îmbunătăţirea metodelor de lucru va permite să se facă noi precizări în acest domeniu, se va putea răspunde la întrebarea dacă există sau nu un antigen comun pentru macromoleculele de colagen din toate ţesuturile şi organele. Precizăm că pînă astăzi existenţa acestui antigen a fost sugerată dar el nu a putut fi identificat.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre investigațiile efectuate în acest domeniu menționăm că, după reinjectarea de extract de tendon de iepure la animalul donator, apar anticorpi circulanți ce leagă complementul, reactivitate cutanată de tip întîrziat și fixarea anticorpilor pe sinovială și în interstițiile a numeroase organe și țesuturi [475]. Menționăm, de asemenea că, după injectare de colagen din tendonul de pasăre spre a induce anticorpi la animale mici de laborator, s-a constatat o reacție încrucișată între fracțiile neutro- și acidosolubile și o reacție directă cu fracția insolubilă; anticorpii fluorescenți care se fixează pe fracțiile solubile au putut fi vizualizați pe fibrele fucsinofile, dar nu și pe membrane bazale, rețele reticulinice, fibre elastice, substanță fundamentală, matrice osoasă și cartilaginoasă. Reacția a apărut cu atît mai intensă cu cît țesutul conjunctiv a avut o structură fibrilară mai densă [695]. La embrion, anticorpul anticolagen solubil s-a fixat pe protoplasma fibroblaștilor și pe fibrele extracelulare cele mai tinere, pe cînd anticorpul anticolagen insolubil nu a reacționat nici cu celulele conjunctive, nici cu fibrele imature [694]. Există însă și condiții experimentale în care anticorpii față de colagenul de șobolan, apăruți în serul de iepure și injectați la donator, au fost fixați pe structuri foarte variate ale țesutului conjunctiv din miocard, ficat, splină, suprarenală, rinichi, jejun, ganglion limfatic, timus, paratiroidă, nerv periferic, aortă, mușchi scheletici, ochi, țesut cerebral. Injectarea de ser normal de iepure nu a fost urmată de fixare de anticorpi pe structurile conjunctive, rezultate negative obținîndu-se și după utilizarea unor anticorpi heterologi pentru colagenul respectiv [920].

Antiserul preparat cu fracția insolubilă a colagenului a dat reacții foarte diferite de la un organ la altul și de la o condiție experimentală la alta [1048].

Nu se pot trage concluzii din rezultatele lucrărilor publicate pînă acum privind antigenicitatea sau lipsa de antigenicitate a macromoleculelor de colagen. Observația că reactivitatea pielei la aceste macromolecule rămîne minimă sau negativă în cursul evoluției diferitelor tipuri de proteze sau filme formate din colagen, indiferent de durata persistenței implantului, pledează pentru o antigenicitate nulă sau foarte slabă[426]. Este însă posibil ca, în cursul anumitor boli, macromoleculele de colagen să fie alterate de modificările de mediu și să devină astfel antigenice. Pe de altă parte, în organism colagenul există sub formă de fracții solubile și insolubile, cu o organizare macromoleculară diferită de aceea din firele chirurgicale, filme sau proteze. În special particularitățile sterice de suprafață pot interveni hotărîtor în favorizarea gradului mai intens de antigenicitate. De aceea este posibil ca forma solubilă, avînd mai multe suprafețe libere pe fiecare macromoleculă, să fie mai activ antigenică decît cea insolubilă, cu o mare parte din suprafețele macromoleculelor blocate prin legăturile intermoleculare. Pare probabil ca aceste particularități de dispoziție sterică să dispară atunci cînd cristalinitatea este total înlocuită cu o masă amorfă, așa cum se întîmplă cînd colagenul se transformă în gelatină. Din datele existente în literatură în legătură cu acest subiect, menționăm constatarea că gelatina nu dă naștere la anticorpi specifici, ci doar nespecifici, observație ce susține ipoteza de mai sus. Plecîndu-se de la această ipoteză, s-a sugerat că în anumite boli și în special în artrita reumatoidă, alterarea fibrelor de colagen din cartilajul articular ar duce la formarea unor complexe coloidale de tipul gelatinei, fapt ce ar explica dispariția capacității colagenului de a stimula formarea de anticorpi specifici și apariția numai a anticorpilor nespecifici[1028].

Scanned with OKEN Scanner

În privința elastinei, menționăm că peptidele obținute prin degradare în soluție alcalină a plăcilor elastice din aorta de bou s-au dovedit antigenice la iepure[905]. Utilizîndu-se elastina marcată cu ^{131}I, s-a constatat că, la iepure apar reacții de precipitare în țesuturi cu peptidele elastinei marcate. Titrurile coborîte obținute ar sugera că doar o fracție limitată a peptidelor elastinei poartă determinantul antigenic. Această fracție ar conține în special desmozina și izodesmozina, aminoacizi implicați în mod particular în formarea legăturilor intermoleculare în fibrele elastice. S-a sugerat că enzime de tipul catepsinei, prin acțiuni lente, de lungă durată, ar putea elibera în circulația generală peptidele antigenice din elastină, iar acestea ar stimula formarea de anticorpi. Anticorpii antielastină au fost puși în evidență și în serul de om, fiind considerați drept autoanticorpi[1031].

Deoarece elastina este o proteină structurală insolubilă, pare probabil că anumiți produși solubili rezultați din degradarea ei nu sînt recunoscuți ca *self* de către celulele imunologic competente. Astfel, ar lua naștere anticorpii care se fixează pe fibrele elastice, în special în acele zone unde apar, la microscop, procese degenerative. Prezența de complexe patologice antigen-anticorp ar constitui un mecanism adjuvant de agravare și extindere a leziunilor.

În ceea ce privește reticulina și membranele bazale, am menționat că lucrări publicate cu un sfert de veac în urmă atrăgeau atenția asupra alterărilor grave glomerulare apărute după administrare de ser specific antirinichi[712]. Ulterior s-a sugerat că proprietățile imunologice ale reticulinei și membranelor bazale ar fi legate de bogăția lor în fracții glucidice, similare cu cele existente în capsulele anumitor bacterii și în substanțele de grup sanguin[240]. Constatarea că membranele bazale renale nu mai leagă anticorpii specifici după digestie cu sialidază, a contribuit la fundamentarea acestei ipoteze, și, în special, la demonstrarea rolului acidului sialic ca sediu principal de cuplare a anticorpilor[508]. Variabilitatea dispoziției sterice a acidului sialic, demonstrată de noi prin metode histochimice, ar putea explica, în parte, marea variabilitate antigenică a membranelor bazale, evidențiată prin metode imunologice [1131], [1135].

În afara acestor antigeni ubicvitari, s-au evidențiat pentru membranele bazale și fibrele reticulinice ale fiecărui organ, antigeni mai mult sau mai puțin specifici[150]. În acest sens pledează și observația că ar exista o diferență netă între antigenicitatea reticulinei și cea a membranelor bazale: glomerulii renali conțin în membrana lor bazală atît antigeni comuni cu alte membrane bazale capilare, cît și cei comuni cu rețelele reticulinice, pe cînd sinoviala nu posedă decît antigeni reticulinici, iar media arteriolelor doar antigeni de tip membrană bazală[980]. S-au mai descris antigeni specifici membranelor bazale de origină mezodermală și epitelială, care nu dau reacții imunologice încrucișate[845].

Condroitin sulfații nu sînt antigenici; în schimb, complexul nativ condroitin sulfat-proteină, de tipul condromucoproteinei, este net antigenic, apărînd, la șoarecii imunizați cu condromucoproteina din cartilajul de bou, teste pozitive de hipersensibilitate cutanată[939]. Antigenicitatea a fost

demonstrată a fi strîns legată : *a*) fie de prezența fracției proteice, fracție care determină atît apariția anticorpilor precipitanți, cît și aglutinanți[1178] ; *b*) fie de prezența condroitin sulfatului A, ce determină, în combinație cu fracția proteică, apariția de reacții încrucișate ale condromucoproteinei de bou cu cea de om sau de porc[274] ; *c*) fie de zona de legătură dintre mucopolizaharid și proteină, zonă care conține o cantitate crescută de serină[665]. Majoritatea autorilor pun pe primul plan ca factor de antigenicitate proteina, constatare susținută de numeroase date ce atestă că, și la acidul hialuronic, și la substanțele de tip heparinic sau la alte tipuri de mucopolizaharide acide, determinantul antigenic ar fi reprezentat de fracția proteică a complexului macromolecular[451]. S-a mai constatat că în complexul condromucoproteic, indiferent de specia de la care a fost izolat, ar exista cel puțin doi determinanți antigenici : unul specific de specie și altul comun tuturor speciilor. Ambii determinanți au fost corelați cu prezența proteinelor în complexul macromolecular, mucopolizaharidele izolate și purificate dovedindu-se inactive din punct de vedere imunologic[937]. S-a sugerat că antigenul comun ar putea fi implicat, ca urmare a reacțiilor încrucișate cu antigenii exogeni, în anumite procese imunologice constatate în cursul evoluției așa-zișelor „boli de colagen''. Existența unei fracții proteice antigenice în complexele mucopolizaharidproteină, indiferent de natura mucopolizaharidului, ar putea explica și reacțiile imunologice obținute experimental după administrare de papaină. Ele se caracterizează prin apariția de anticorpi legați de complement și precipitabili în prezența unor extracte tisulare omologe și heterologe, conținînd complexe mucoprotidice. Tabloul patologic indus prin administrarea de papaină a fost asemănat, pînă la un anumit punct, cu modificările imunologice care apar în boli autoimune. S-a sugerat că în aceste boli ar putea fi implicate macromolecule din țesutul conjunctiv, în mod obișnuit inaccesibile celulelor imunologic competente, fiind incluse în complexe insolubile sau acumulate în țesuturi lipsite de circulație sanguină și limfatică. Exemplul cel mai demonstrativ ar fi tocmai condromucoproteina ce alcătuiește substanța fundamentală a cartilajului, pe care celulele imunologic competente nu o recunosc ca *self*, apărînd astfel o hipersensibilizare la un autoantigen secvestrat[450].

O glicoproteină extrasă prin mijloace blînde din peretele aortei, conținînd 78,6% polipeptide, 13,8% azot, 2,17 % acid sialic, 5,7% hexoze și 3,4% hexozamine, s-a dovedit a fi puternic antigenică, sugerînd mecanisme patogenice noi în patologia vasculară[888].

S-a obținut și un antiser activ față de o glicoproteină a mediei aortei cu leziuni de ateroscleroză și care nu a dat reacții încrucișate cu glicoproteinele serice și cu lipoproteinele[31].

Menționăm că s-a reușit prepararea unui antiser prin imunizarea iepurilor cu o suspensie de intimă de aortă de bou, incorporată în adjuvant Freund și avînd drept component antigenic principal un complex lipoprotidic[742]. La iepuri, injectarea unui broiaj de aortă de șobolan și de adjuvant Freund, a determinat în mod constant apariția de leziuni arteriale grave și difuze, unele interesînd vasele în toată lungimea lor. Adjuvantul mărește

intensitatea şi frecvenţa leziunilor, fără a fi însă indispensabil obţinerii lor[943]. Leziunea iniţială pare să fie edemul ce infiltrează intima şi zona internă a mediei. Ulterior, apare o multiplicare a celulelor subendoteliale, îngroşarea intimei, înmulţirea fibrelor de colagen, degradarea şi calcificarea fibrelor elastice. Celulele musculare degenerează şi apare o necroză disecantă a mediei arterelor. În faza finală se instalează procese cicatriciale şi calcificări patologice, realizînd imagini, pînă la un anumit punct, asemănătoare cu cele întîlnite în ateroscleroză[944].

PROLIFERĂRI NEOPLAZICE

Concepţiile patogenice asupra cancerului nu au acordat pînă în prezent decît o importanţă cu totul neînsemnată modificărilor în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv, ca factor de favorizare sau de inhibare a apariţiei, dezvoltării şi diseminării tumorilor maligne. În multe tratate şi monografii de specialitate se repetă prin tradiţie o afirmaţie, datînd de la sfîrşitul secolului trecut, conform căreia reacţiile ţesutului conjunctiv din jurul tumorii constituie un mecanism de apărare ineficace. „Envahi par les cellules neoplasiques, le mésenchyme réagit, puis subit la loi du conquérant et le sert'' [711]. Observaţii anatomo-clinice demonstrează însă că nu în toate cazurile această afirmaţie îşi găseşte justificarea. Analiza reacţiei stromei în jurul tumorilor şi metastazelor cancerului gastric, efectuată pe 270 de cazuri după gastrectomie curativă, a dus la următoarele concluzii: la pacienţii cu reacţie importantă fibroasă a ţesutului conjunctiv peritumoral, supravieţuirea a fost de 100% la 5 ani de la intervenţia chirurgicală, neexistînd nici metastaze decelabile prin examenul microscopic; la pacienţii cu o reacţie stromală discretă, supravieţuirea a fost de numai 30% după aceiaşi perioadă de timp, iar la cei cu absenţa organizării peritumorale a ţesutului conjunctiv şi cu metastaze, supravieţuirea a fost de numai 7%. Concluzia acestor investigaţii a apărut cît se poate de demonstrativă şi anume că intensitatea reacţiei stromale peritumorale a dominat prognosticul bolii[522]. Alte studii anatomo-clinice, efectuate pe cancerele cervico-uterine au permis să se demonstreze că neoplasmele cu perete conjunctiv continuu în jurul proliferărilor tumorale nu au prezentat metastaze şi au avut o evoluţie clinică extrem de favorabilă. Dimpotrivă, cele cu organizări fibroase discontinui sau absente, au metastazat rapid şi au evoluat mult mai grav[476].

Aceste două exemple demonstrează că modul de organizare macromoleculară a ţesutului conjunctiv în jurul proliferărilor neoplazice este departe de a constitui un factor de importanţă secundară în apariţia, dezvoltarea şi diseminarea cancerului. El trebuie cît mai adînc şi mai complet analizat, întru cît poate deschide orizonturi noi de intervenţie terapeutică.

Alterarea organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv din jurul proliferărilor neoplazice poate lua, în primul rînd, aspectul unui proces inflamator, cu particularităţile descrise în paginile anterioare.

De multe ori însă procesul inflamator este foarte discret, pe primul plan intervenind variate tipuri de acțiuni enzimatice și acumulări de macromolecule, neîntîlnite în inflamațiile obișnuite.

Capacitatea celulei canceroase de a modela țesutul conjunctiv din jur depinde, în primul rînd, de eficacitatea enzimelor cu acțiune glico- și proteolitică pe care este capabilă să le sintetizeze. Efectele lor se traduc, din punct de vedere microscopic, prin alterarea stabilității structurale a substanței fundamentale, a fibrelor de colagen și de reticulină, a lamelor elastice și a membranelor bazale, apărînd sub aspecte de disociere, fragmentare și liză. Observații mai vechi au atras atenția că, în carcinogeneza experimentală, se văd alterări ale fibrelor colagene la aproximativ două săptămîni de la dezvoltarea cancerului, iar, la trei luni, se fragmentează și fibrele elastice[282]. Dacă se aplică tratamente cu gudron se disociază, în mod special, fibrele fucsinofile ale dermului[145], procesul apărînd încă din faza precanceroasă a dezvoltării tumorii. Alterarea structurilor fibrilare ale țesutului conjunctiv, colagene, reticulinice și elastice, încă din perioada cînd tumora experimentală nu are încă aspectul net malign, a fost menționată de numeroși autori, subliniindu-se capacitatea celulelor care proliferează de a transforma aceste fibre într-o masă amorfă[1142]. Observațiile microscopice au sugerat și variate ipoteze, unele susținînd că tumora își pregătește frontul de invazie prin distrugerea prealabilă a barierelor conjunctive, altele atribuind produșilor rezultați din degradarea fibrelor, capacitatea de a stimula proliferarea neoplazică. În special în cancerul experimental al pielei s-a ajuns la concluzia că alterările organizării macromoleculare a țesutului conjunctiv premerg apariția cancerului[819]. La om s-a constatat în mod particular tendința de degenerare a fibrelor elastice din derm, precum și apariția unui tip special de „degenerescență elastozică" a fibrelor de colagen ce devin colorabile cu metodele de evidențiere a țesutului elastic. Procesul a fost interpretat ca reflectînd elaborarea unui tip anormal de macromoleculă de colagen în stadiul de precancerizare a pielii[381]. Analize histochimice ulterioare au demonstrat că, după tratarea pielii cu hidrocarburi cancerigene, evoluția spre tumoră malignă nu mai are loc dacă în derm s-a produs un proces de fibroză. În aceste regiuni proliferarea epiteliului se oprește, rămînînd în stadiul de tumoră benignă. Dimpotrivă, dacă reacția țesutului conjunctiv din derm nu evoluează spre fibroză, ci spre degradarea fibrelor, invazia epiteliului continuă progresiv în zone tot mai adînci ale pielii și aspectul de hiperplazie a celulelor epiteliale este treptat înlocuit cu o transformare malignă[690]. S-a constatat existența unei interrelații între tipul hidrocarburii cancerigene și reactivitatea țesutului conjunctiv. Dacă pe piele se aplică 20-metilcolantren și 3—4 benzpiren, alterările fibrelor conjunctive sînt mai puțin nete decît după aplicarea de 9—10 dimetil 1—2 benzantracen, ultimul tip de hidrocarbură fiind și mai intens cancerigen[690]. Astfel, capacitatea celulelor precanceroase, și apoi canceroase, de a creia o permanentă stare de hipostabilitate structurală, apare ca un mecanism patogenic demn de a fi luat în seamă în studiul tumorilor maligne. Prognosticul grav pare să fie dependent în mare măsură, de rezultatul interacțiunii dintre enzimele hidrolitice elabo-

Scanned with OKEN Scanner

rate de celulele precanceroase sau canceroase, pe de o parte, şi structurile conjunctive dotate cu un grad mai scăzut sau mai ridicat de stabilitate structurală pe de altă parte. Progresiunea tumorii este favorizată cînd normostabilitatea este convertită în hipostabilitate structurală, iar regresiunea sau staţionarea evoluţiei de convertirea normostabilităţii în hiperstabilitate. O metodă demonstrativă de a constata efectul hipostabilizant al enzimelor celulei neoplazice este urmărirea contururilor membranelor bazale colorate cu PAS. Discontinuitatea membranei semnalează începutul stadiului de invazie neoplazică, într-o fază cînd alte metode clinice şi de laborator nu pot evidenţia acest proces[821]. Metoda este recomandată în studiul cancerului uman şi experimental[775].

Dintre mecanismele de alterare a stabilităţii variatelor structuri ale ţesutului conjunctiv, ne vom opri în primul rînd asupra acelui de *spreading factor*, exercitat de numeroase celule canceroase prin intermediul elaborării de enzime de tipul hialuronidazei testiculare. Ca urmare a acţiunii acestor enzime, substanţa fundamentală este menţinută într-o stare de polimerizare redusă — de hipostabilitate structurală, conform concepţiei noastre — rezultînd o creştere a permeabilităţii care permite deplasarea mai uşoară a celulelor canceroase. Metodele histochimice pot evidenţia acest tip special de substanţă fundamentală, asemănătoare celei din ţesutul conjunctiv embrionar sau din ţesutul de granulaţie foarte tînăr. Investigaţii analitice au ajuns la concluzia că ar exista un raport direct între bogăţia interstiţiilor peritumorale în substanţă fundamentală slab polimerizată şi capacitatea de invazie şi de diseminare a tumorii. Astfel, pe 115 cazuri de tumori laringiene s-a constatat că, cu cît acidul hialuronic slab polimerizat era mai abundent în jurul proliferărilor neoplazice, cu atît puterea de metastazare a cancerului a fost mai mare[235]. Alte cercetări subliniază acelaşi paralelism[151, 355, 881, 1003].

Pe aceiaşi linie, menţionăm concluziile unor investigaţii care au demonstrat că, după extirparea la şoarece a unui prim nodul canceros al glandei mamare, au apărut metastaze la 50% dintre animale. Dacă după extirpare şoarecii erau trataţi cu hialuronidază, procentul animalelor cu metastaze a crescut la 85%, evidenţiindu-se astfel rolul favorizant jucat de depolimerizarea substanţei fundamentale în procesul de diseminare. Dacă animalele erau injectate cu ser antihialuronidazic, procesul de metastazare scădea la numai 25,9%[666]. Se susţine că efectul antimetastazant exercitat de anumite doze de raze X s-ar datora inhibării sintezei enzimelor de tip hialuronidazic de către celulele neoplazice[686]. Pe linia aceleiaşi ipoteze, se poate presupune că infecţiile supraadăugate cu microorganisme ce sintetizează enzime de tip hialuronidazic, pot constitui factori de favorizare a invaziei şi a metastazării cancerelor. Razele ultraviolete, ca şi anumite medicamente ar acţiona prin intermediul stimulării sintezei de hialuronidaze, sau al eliberării lor din lizozomi. În acelaşi sens pot acţiona toţi factorii ce diminuă nivelul seric al inhibitorului hialuronidazei [12].

Asociat cu efectele enzimatice, se pot produce depolimerizări ale substanţei fundamentale bogate în acid hialuronic, prin intermediul mecanismelor de oxido-reducere, menţionate anterior.

Problema importanţei tipului de macromolecule elaborate de celula neoplazică însăşi pentru dezvoltarea ulterioară a cancerului, este extrem de puţin studiată. Analizele noastre histochimice asupra unor adenocarcinoame mucosecretante, nu ne-au permis, cel puţin pînă acum, să evidenţiem modificări calitative în tumora primitivă şi în mestastaze, în comparaţie cu epiteliul normal. Aceste rezultate negative se pot datora, în mare parte, sensibilităţii limitate a metodelor utilizate. În cazurile în care celulele neoplazice elaborează mari cantităţi de mucopolizaharide acide de tip heparinic, se constată apariţia de complicaţii prin tulburări ale mecanismelor de coagulare, uneori urmate de leziuni tromboembolice[44]. Dacă substanţa elaborată este de tipul condroitin-sulfaţilor, celula tumorală însăşi poate creia în jurul său condiţiile favorabile dezvoltării fibrelor conjunctive şi poate fi „sufocată" prin procesul de fibroză peritumorală. Menţionăm că în tumorile de tip sarcomatos s-au evidenţiat şi sinteze de macromolecule de colagen, unele prezentînd un grad mai accentuat de precipitare fibrilară decît colagenul normal[584].

O ultimă problemă pe care dorim să o discutăm este aceea a posibilităţii existenţei unei acţiuni anticanceroase, exercitată de substanţele care intră în organizarea macromoleculară a structurilor ţesutului conjunctiv. Se pot da numeroase exemple de epitelioame ale glandei mamare care prezintă o evoluţie extrem de lentă şi conţin un ţesut conjunctiv foarte dezvoltat şi, invers, tumori cu stromă redusă şi evoluţie rapidă. Aspecte similare pot fi întîlnite în patologia gastrică, uterină etc. Extractele ţesutului conjunctiv din tumorile mamare cu evoluţie foarte lentă au acţiune inhibantă asupra multiplicării celulelor canceroase[885]. Un produs de tip glucosaminic, extras din ţesutul conjunctiv din jurul unui cancer experimental, s-a dovedit capabil să altereze metabolismul celulei tumorale[94], injectarea lui mărind durata de supravieţuire a animalelor[652].

Datele prezentate aduc un număr limitat de rezultate pe linia demonstrării rolului jucat de alterările organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv în procesul de trecere de la precancer la cancer, precum şi în procesele de invazie şi diseminare a tumorilor maligne. Ele trebuiesc considerate ca puncte de plecare pentru investigaţii cît mai variate şi mai largi în acest domeniu. În acelaşi timp, se atrage atenţia fiecărui medic practician că, modelînd ţesutul conjunctiv peritumoral prin intermediul iradiaţiilor sau al unor agenţi terapeutici care inhibă sinteza de colagen şi de mucopolizaharide acide sulfatate (cortizonul, ACTH-ul etc.), se pot crea condiţii favorabile invaziei şi diseminării tumorilor. Dimpotrivă, folosind mijloace terapeutice ce potenţează apariţia unui ţesut de fibroză peritumorală, diminuăm capacitatea de evoluţie şi de metastazare a cancerului. O altă concluzie de interes practic imediat este aceea de a acţiona în sensul împiedicării formării, sau al eliminării după ce s-a format, a substanţei funadmentale bogate în acid hialuronic. În acest scop ne pot fi de un real folos biopsiile, care ajută să interpretăm dinamic particularităţile metabolice ale celulelor tumorale şi gradul de stabilitate structurală a macromoleculelor ţesutului conjunctiv peritumoral.

Scanned with OKEN Scanner

ATEROSCLEROZA

Probleme de histogeneză

Cînd medicul este chemat să dea asistenţă unui bolnav cu ateroscleroză, leziunile sînt foarte avansate. Examenele clinice şi de laborator pun în evidenţă caracterul lor stenozant, dublat de pericolul de tromboză. Terapeutica preventivă este tardivă, iar cea curativă puţin eficace. Aşa se explică dece, astăzi, mortalitatea prin afecţiuni coronariene şi ale vaselor cerebrale reprezintă, la grupele ce au atins şi au depăşit vîrsta adultă, o treime din totalul mortalităţii generale. Şi mai grav este faptul că mortalitatea şi morbiditatea pare a fi în continuă creştere, reflectînd modestele posibilităţi de care dispunem spre a împiedica apariţia şi evoluţia aterosclerozei.

Pentru lămurirea etiopatogeniei acestei afecţiuni, timp de o jumătate de secol, s-au depus eforturi uriaşe, atît în domeniul investigaţiilor clinice, anatomo-patologice, fiziopatologice, biochimice şi experimentale, cît şi în cel al alimentaţiei, igienii şi patologiei comparate. Rezultatele acestor cercetări au fost atît de limitate, încît astăzi nu putem decît să afirmăm că apariţia bolii pare intricată cu procesele de creştere, de adaptare şi de senescenţă ale arterelor, ateroscleroza fiind favorizată de alterări în: *organizarea macromoleculară a peretelui vascular* (modificări în metabolismul şi funcţia celulelor musculare netede şi a fibroblaştilor, în stabilitatea structurală a substanţei fundamentale şi a fibrelor, în paternul elastinei, colagenului şi mucopolizaharidelor etc.); *hemodinamica sanguină* (creşteri anormale ale presiunii arteriale, *stress*-uri pulsatile, flux turbulent etc.); *constituenţii plasmatici* (paternul lipidelor şi al factorilor de coagulare).

Înainte de a trece la analiza alterărilor în organizarea macromoleculară a elementelor conjunctive din peretele vascular, considerăm util să precizăm anumite date care au modificat concepţia simplistă că numai hipercolesterolemia ar constitui factorul fundamental în etiopatogenia acestei boli. Importanţa cunoaşterii acestor date, în afara interesului medical general, rezidă şi în faptul că, datorită lor, a luat un avînt deosebit investigarea rolului peretelui arterial în morfogeneza aterosclerozei.

Pe primul plan vom cita cercetările de patologie comparată, care au demonstrat că ateroscleroza pare a fi un fenomen biologic general şi nu o boală particulară omului[1092]. Modul de viaţă extrem de diferit în care trăiesc anumite poichiloterme, precum şi homeotermele, fie ierbivore, fie carnivore, nu constituie un factor hotărîtor în împiedicarea apariţiei unor leziuni, considerate similare, pînă la un anumit punct, aterosclerozei umane. Frecvenţa cu care a fost întîlnită ateroscleroza la unele ierbivore sau la pinguinii care se hrănesc cu grăsime de peşte (considerată de noi ca antiaterogenică) poate fi cu greu asociată teoriilor privind obligativi-

tatea existenţei unei hipercolesterolemii pentru apariţia bolii. Reţinem, în plus, din numeroasele observaţii publicate în acest domeniu, că la reptile, păsări şi mamifere, leziunile de ateroscleroză se localizează în special pe aortă şi par a fi extrem de rare la nivelul coronarelor şi al vaselor cerebrale, în comparaţie cu datele cunoscute din patologia umană. Ori, tocmai la nivelul coronarelor şi al vaselor cerebrale există la om cele mai multe dubii că acumularea de lipide ar constitui cauza principală a evoluţiei spre tromboze şi spre exitus[835].

În al doilea rînd, s-au acumulat suficiente date care demonstrează că ateroscleroza pare să fie mai puţin o boală a unui perete arterial traversat de o plasmă cu paternul lipidelor modificat, ci mai mult o afecţiune determinată de efectele prelungite ale condiţiilor hemodinamice locale asupra acestui perete. Astfel, o autogrefă din vena jugulară, implantată în artera unui animal cu hipercolesterolemie prezintă, după un anumit timp, leziuni de ateroscleroză experimentală, cu rezerva ca implantarea să aibă loc în zonele cunoscute a fi „susceptibile" la ateroscleroză[900]. Aspecte asemănătoare au fost ulterior constatate şi după implantarea de homografe de vene umane[1030]. Şi mai interesante ni se par observaţiile menţionînd că protezele vasculare din dacron, inserate în aortă, sînt acoperite mai întîi cu un endoteliu, apoi se formează o „pseudo-intimă", începînd să se acumuleze lipide, pînă la formarea de plăci tipice[337, 1046, 1058].

O dovadă în plus asupra particularităţilor locale în determinarea apariţiei leziunilor aterosclerotice (în prezenţa aceluiaşi nivel al colesterolului seric) o constituie observaţia că homografele de aortă toracică de cîine, implantate în aorta abdominală, rămîn slab susceptibile la ateroscleroză, deşi segmentul abdominal din jur se încarcă intens cu lipide; invers, dacă se implantează un fragment din aorta abdominală în porţiunea toracică, peretele arterial de origină abdominală acumulează o mare cantitate de lipide, pe cînd zonele din jurul implantului rămîn, în continuare, puţin susceptibile la ateroscleroză[435]. Astfel se conturează concluzia că susceptibilitatea peretelui arterial însuşi, mai curînd decît poziţia sa anatomică şi particularităţile topografice, poate constitui un factor important în determinarea apariţiei şi gravităţii evoluţiei leziunilor de ateroscleroză.

În al treilea rînd, subliniem că, deşi există la dispoziţia cercetătorilor o impresionantă varietate de metode moderne, nu s-a putut stabili pînă acum cu precizie nici dacă lipidele acumulate în leziunile de ateroscleroză sînt numai de origină plasmatică, sau numai de origină locală (sinteze şi procese degenerative), sau provin din ambele surse şi nici în ce proporţie se află în fiecare tip de leziune. De asemenea, nu s-a putut aduce pînă astăzi nici un argument hotărîtor care să demonstreze că aşa-numitele striuri lipidice ce se întîlnesc la copii şi uneori chiar la nou-născut, ar avea vreo legătură cauzală şi morfogenetică cu plăcile de ateroscleroză de la adult şi bătrîn. Anumite rezultate susţin că dispoziţia topografică a striurilor lipidice nu se suprapune cu aceea a plăcilor întîlnite în leziunile aterosclerotice[978], după cum există date care atestă că striurile lipidice sînt foarte frecvente la grupe de populaţie cu o incidenţă redusă a aterosclerozei [1043]. Mai trebuie menţionat că nu există nici o dovadă a unei interdependenţe

între nivelul colesterolului seric şi apariţia striurilor lipidice care, aşa cum am mai subliniat, pot fi evidenţiate uneori imediat după naştere. Atragem atenţia şi asupra unor date de histochimie care demonstrează un patern diferit al lipidelor din striuri şi din plăci[10]. Nivelul actual al cunoştinţelor noastre în domeniul aterosclerozei nu ne permite să afirmăm că anumite striuri lipidice de la copil evoluează spre plăcile de la adult şi că pericolul dezvoltării aterosclerozei creşte cu cît aceste striuri sînt mai numeroase. În prezenţa unor leziuni mici nu putem să afirmăm, dacă ele reprezintă striurile lipidice din copilărie şi deci sînt foarte vechi, sau stadii incipiente ale unor plăci aterosclerotice, apărute foarte recent. De altfel există mari lacune şi în ceea ce priveşte cunoaşterea ritmului de dezvoltare a unei leziuni de ateroscleroză. De aceea avem tot dreptul să considerăm o placă lipidică drept o leziune mai veche, dar nu putem susţine *ipso facto* că striurile de la adult sînt leziuni recente pentru că au dimensiuni mici. Ori, tocmai aceste leziuni cu dimensiuni mici se întîlnesc frecvent în coronare şi arterele cerebrale, îngreunînd considerabil posibilităţile noastre de a preciza momentul apariţiei şi ritmul dezvoltării aterosclerozei.

În al patrulea rînd, trebuie subliniat că, deşi gravitatea aterosclerozei sub aspect medical şi social-economic este dată de alterarea coronarelor şi arterelor cerebrale, nu dispunem de o bază ştiinţifică spre a putea corela dezvoltarea afecţiunii sub aspect general, cu aceste localizări particulare de maximă gravitate. Analize efectuate pe material necropsic de la soldaţii americani morţi în cursul războiului din Corea, au evidenţiat, la indivizi cu leziuni discrete ale aortei, existenţa la 12,3% din cazuri a unei obstruări de peste 50% a lumenului coronarelor, iar la 5,3%, a unei obstruări de peste 90% [306]. O altă analiză efectuată asupra personalului aviaţiei americane, în vîrstă între 17 şi 24 de ani, fără leziuni aterosclerotice importante ale aortei a demonstrat, la aproximativ 5% din cazuri, un grad avansat de stenoză a coronarelor [710]. Trebuie reţinută de asemenea şi constatarea că, fără să se modifice substanţial modul de viaţă, de alimentaţie şi ritmul de muncă al populaţiei anumitor ţări, incidenţa mortalităţii prin tromboze coronariene a crescut în ultimii 50 de ani [190], [765]. Nici unul dintre modelele experimentale existente în domeniul aterosclerozei, bazate pe adăugarea de colesterol şi de alte tipuri de lipide la dietă, pe dereglări ale constelaţiei hormonale sau pe variate stări de privaţiune, nu poate fi folosit spre a explica mulţumitor aceste constatări. Modelele experimentale sînt necorespunzătoare la ora actuală spre a ne ajuta să explicăm de ce la om leziunile de ateroscleroză apar în coronare cu aproximativ două zeci de ani mai devreme decît în arterele cerebrale; de ce în arterele cerebrale, la acelaşi grup de vîrstă de bătrîni, bazilara este mai intens lezată decît cerebrala mijlocie şi aceasta din urmă, decît cerebrala anterioară [717]; de ce artere cum sînt cubitala sau radiala nu prezintă în cursul vieţii nici îngroşări ale intimei, nici acumulări lipidice, deşi sînt străbătute de aceiaşi constituenţi plasmatici ca şi vasele în care se acumulează beta-lipoproteine şi fibrinogen; de ce la copiii cu gargoilism (boala Hurler) apar obliterări ale lumenului coronarelor ca în ateroscleroză, fără să existe alterări ale metabolismului lipidic, ci doar dereglări în sinteza şi metabolizarea unor

mucopolizaharide acide[110], [721]; de ce femeile, ovariectomizate bilateral în jurul vîrstei de 35 de ani, prezintă la 50 de ani o incidenţă mai mare de ateroscleroză coronariană decît cele normale sau cele ovariectomizate doar unilateral [812]; de ce în arterele de tip elastic cu diametrul în jur de 3 cm, leziunile aterosclerotice evoluează foarte rar spre complicaţii mortale, în comparaţie cu arterele de tip muscular cu diametru de aproximativ 2—3 mm (coronare, cerebrale, renale, mezenterice), în timp ce în arterele cu diametru de aproximativ 300 μ, nu apar nici infiltraţii lipidice, nici alterări ale intimei, predominînd hiperplazia, hialinizarea şi necroza mediei.

În sfîrşit, în al cincilea rînd, nu dispunem încă de date ştiinţific fundamentate privind legătura histogenetică dintre placa lipidică şi tromboze. Există anumite dovezi care susţin că lipidele din arterele trombozate provin nu din constituenţi plasmatici, ci din procese degenerative locale [362]. Dimpotrivă, îngroşarea intimei pare a fi un factor obligator în apariţia ulterioară a trombozei, indiferent de prezenţa sau absenţa lipidelor, în general trombusul putînd fi evidenţiat atunci cînd lumenul s-a redus cel puţin cu 1/3 din diametrul iniţial [10]. Fără a diminua valoarea unor date privind dezvoltarea predominantă a trombozelor pe plăci lipidice ulcerate, atragem atenţia şi asupra cercetărilor care argumentează pentru existenţa iniţială a unei tromboze care ulterior se poate infiltra cu lipide [289], [290], [724]. Trombusul devine astfel cauza apariţiei anumitor plăci ateromatoase şi nu consecinţa existenţei acestor plăci.

Desigur că s-ar putea prelungi încă mult aceste exemplificări, în ultimă instanţă ducînd la concluzia menţionată de unul dintre noi: cercetările în domeniul aterosclerozei vor fi cu atît mai rodnice „cu cît ne vom convinge mai curînd că este foarte greu, studiind acrta iepurilor intoxicaţi cu colesterol, să înţelegem de ce mor oamenii prin tromboze coronariene şi cerebrale" [1103].

„Susceptibilitatea" peretelui arterial

Un aspect particular legat de modificarea organizării macromoleculare a peretelui arterial în cursul apariţiei aterosclerozei şi care este din ce în ce mai bine conturat, apare inclus sub denumirea de „susceptibilitate" a vasului la această boală. De aproape un secol, numeroase observaţii demonstrează că ateroscleroza nu se dezvoltă cu aceiaşi intensitate la toate speciile animale, în toate arterele aceluiaşi organism şi nici chiar în variatele segmente ale aceluiaşi vas. Este unanim acceptată astăzi constatarea că, la om, această afecţiune lezează mult mai frecvent coronarele şi vasele cerebrale, în comparaţie cu arterele de dimensiuni similare ale celorlalte viscere; este întîlnită mult mai des în iliaca internă, în comparaţie cu cea externă; prezintă o evoluţie mai gravă a leziunilor şi o întindere mai mare pe suprafaţa aortei abdominale, în comparaţie cu crosa şi segmentul toracic al aceluiaşi vas; apare mai larg extinsă pe peretele posterior, în comparaţie cu cel anterior al aceluiaşi segment al aortei toracice; are tendinţa de a leza cu o mult mai mare intensitate zonele de

bifurcare şi de emergenţă ale ramurilor colaterale ale arterelor mari, în comparaţie cu porţiunile de perete vascular situate între aceste zone; nu apare în arterele mari decît pînă la un anumit diametru al lumenului, lăsînd indemne arterele mici, arteriolele şi venele; nu afectează artera pulmonară decît în cazuri de hipertensiune prelungită în mica circulaţie.

La aceste constatări, izvorîte din analiza materialului necropsic, s-au adăugat numeroase observaţii efectuate pe animale de laborator, indicînd lipsa lor de rezistenţă, sau dimpotrivă, totala lor rezistenţă la constituirea modelului experimental al aterosclerozei. Astfel s-a cristalizat noţiunea de „susceptibilitate" la această boală a anumitor specii, artere şi segmente de artere, căutîndu-se să se clarifice prin studii multidisciplinare ce factori generali, de ordin hemodinamic şi particulari, de ordin fizico-chimic, biochimic, mecanic şi metabolic, determină „susceptibilitatea" la ateroscleroză. Problema astfel conturată are şi un anumit interes practic, apărînd perspectiva modificării dinamicii funcţionale şi structurale a arterelor sau a segmentelor de arteră intens lezate de ateroscleroză, după paternul existent în vasele care rezistă dezvoltării acestei boli. Vom prezenta rezultatele investigaţiilor în acest domeniu, pe baza metodologiei folosită de autorii respectivi.

Studiile de hemodinamică au demonstrat că peretele arterial are un tip special de organizare macromoleculară, adaptată să reziste la presiunile şi tracţiunile longitudinale şi radiale exercitate de către unda pulstatilă, de care peretele este stresat de $2{,}6 \times 10^{9}$ ori, în decurs de 70 de ani [9]. Viteza axială a fluxului sanguin nu este uniformă în lungul aceluiaşi vas, crescînd la bifurcaţii, ramificaţii de colaterale şi la curburi. După anumiţi autori, această creştere a vitezei axiale s-ar însoţi de o reducere importantă a presiunii laterale exercitate de coloana de sînge asupra peretelui arterial, rezultînd un proces de „sucţiune" a intimei, care herniază spre lumen. Teritoriile sucţionate se umplu progresiv cu celule musculare netede migrate din medie şi care încep să elaboreze un ţesut conjunctiv imatur, constituind zone de elecţie pentru reţinerea anumitor constituenţi plasmatici de tipul fibrinogenului şi a beta-lipoproteinelor, ce traversează în mod fiziologic peretele arterial de la endoteliu spre adventice. În lumina acestui concept al genezei aterosclerozei [1066], legile dinamicii fluidelor sînt considerate ca factor primar al susceptibilităţii la ateroscleroză a anumitor teritorii vasculare, boala apărînd ca o consecinţă a faptului că aceste legi se exercită în condiţiile funcţionării aparatului cardio-vascular. Particularităţile individuale în susceptibilitatea la ateroscleroză apar astfel ca fiind determinate, în primul rînd, de intensitatea reacţiei peretelui arterial la procesul de „sucţiune", determinat de scăderea presiunii intralumenale. În sprijinul acestei ipoteze se înscriu şi o serie de observaţii care demonstrează formarea unui ţesut conjunctiv subendotelial în segmentele de arteră ţinute între două ligaturi şi deci cu o considerabilă scădere a presiunii laterale intralumenale [168], precum şi apariţia aceleiaşi „intime" în arterele animalelor cu colaps experimental [177]. În ambele experimente „intima" a luat naştere printr-un mecanism similar: herniere sau migrare subendotelială a celulelor musculare netede din medie

Scanned with OKEN Scanner

şi sintetizarea unui ţesut conjunctiv imatur, prezentînd o capacitate mai mare de a reţine fibrinogenul şi lipidele decît intima apărută în condiţii fiziologice [395]. Alte studii asupra factorilor hemodinamici sugerează apariţia în sistemul arterial a unor graniţe de separare a fluidelor circulante. În special datorită obstacolelor naturale reprezentate de curburi, bifurcaţii şi emergenţe, din coloana axială cu viteză crescută se separă zone cu circulaţie încetinită sau chiar de stază. În aceste zone ar fi favorizată aderarea plachetelor care determină reţinerea fibrinogenului şi, ulterior, a lipidelor plasmatice, trombusul fiind de multe ori inclavat în zona subendotelială a intimei [341]. Aceste zone de stază s-ar găsi în dreptul teritoriilor considerate că ar avea susceptibilitatea maximă la ateroscleroză.

La un pol diametral opus se situează lucrările care susţin că intensitatea crescută a microtraumatismelor exercitate de către unda pulsatilă asupra anumitor teritorii arteriale ar determina o creştere a permeabilităţii locale, asociată cu reacţii locale de adaptare care vor constitui patul dezvoltării aterosclerozei. Printre reacţiile de adaptare s-au menţionat acumulările de substanţă fundamentală, neoformările de fibre elastice şi colagene în zonele cu lame elastice fragmentate, formarea de perniţe ale intimei etc.[309]. Pe aceiaşi linie de interpretare s-ar explica, pe plan anatomo-clinic, incidenţa crescută a aterosclerozei la subiecţi cu hipertensiune arterială, fapt general admis în literatura de specialitate.

Concomitent cu efectele hemodinamice determinate de scăderea sau de creşterea presiunii intralumenale, apariţia aterosclerozei în zone de elecţie ar mai putea fi favorizată şi de existenţa unor focare de turbulenţă, a unor unde reflectate şi a altor perturbări hemodinamice asupra cărora nu insistăm. Fără a împărtăşi opiniile autorilor care încearcă să explice susceptibilitatea la ateroscleroză numai prin prizma legilor mecanicii fluidelor, aplicate la aparatul cardio-vascular, considerăm la fel de unilaterală poziţia celor care fac complet abstracţie de ele. În contextul factorilor care determină sau favorizează susceptibilitatea la ateroscleroză a anumitor teritorii arteriale, microtraumatismele hemodinamice se impun pe primul plan. Precizăm în încheiere, că intimele modificate de microtraumatismele hemodinamice, aşa cum apar la bifurcaţii, emergenţe sau curburi, nu au numai o capacitate particulară de a reţine fibrinogenul şi lipidele; ele sînt sediul acumulării nespecifice a numeroşi alţi constituenţi plasmatici şi a unor substanţe administrate parenteral.

Observaţiile microscopice au atras atenţia în mod special asupra îngroşării considerabile a intimei în zonele considerate susceptibile la apariţia leziunilor de ateroscleroză. Acest proces a fost analizat în capitolul anterior, fiind prezentat ca o particularitate a îmbătrînirii arterelor. Trebuie însă precizat că, deşi îngroşarea intimei poate fi acceptată ca un factor important ce pregăteşte sau determină dezvoltarea plăcii de aterom, această placă nu apare ori unde şi ori cînd, în prezenţa unei intime îngroşate. Fără a repeta mecanismele implicate în producerea acestei hiperplazii, menţionăm observaţii atestînd ca ateromul se formează

cînd grosimea intimei atinge cel puţin 0,37 mm [258]. El este precedat de un proces de necroză, interesînd substanţa fundamentală şi fibrele reticulinice. Necroza este frecvent întîlnită cînd îngroşarea intimei se apropie de 0,50 mm şi devine constantă după 0,83 mm. De reţinut că grosimea intimei coronarelor „normale" de adult variază între 0,17 şi 0,20 mm, prezentînd o tendinţă la creştere progresivă o dată cu îmbătrînirea. Aşa s-ar explica frecvenţa apariţiei de focare de necroză în coronare în comparaţie, de exemplu, cu arterele cerebrale, întru cît intima coronarelor este de aproximativ 4 ori mai îngroşată.

Corelaţia dintre grosimea intimei şi „susceptibilitatea" la ateroscleroză a peretelui arterial a sugerat ipoteza existenţei unor „spaţii" de filtrare a lipidelor şi fibrinogenului care traversează vasul dinspre lumen spre adventice. Teoretic, traversarea devine cu atît mai lentă, cu cît există o distanţă mai mare între endoteliu şi medie, respectiv o intimă mai îngroşată. Tot teoretic, zonele de necroză care apar în intimele mult îngroşate pot constitui bariere în calea trecerii lipidelor şi fibrinogenului, favorizînd stagnarea şi acumularea lor. Observaţiile experimentale după utilizarea colesterolului marcat cu ^{14}C nu au adus argumente pentru ipotezele menţionate. Într-adevăr, cantitatea de colesterol ce pătrunde în peretele îngroşat scade cu cît creşte grosimea peretelui, iar în zonele de necroză sau cu organizare fibroasă radioizotopul a fost găsit mult mai rar decît în vasul normal [325], [405], [886]. În schimb, există anumite dovezi morfologice care pot pleda pentru o continuă încorporare în grosimea intimelor, a fibrinogenului precipitat sub formă de reţea de fibrină. Încorporarea apare sub aspectul „stratificăriilor geologice" şi poate fi preludiul atît al unei simple plăci de aterom, cît şi al unei tromboze ocluzive. După anumite observaţii experimentale, nu necroza, ci edemul ce precede necroza ar constitui un factor de reţinere a lipidelor serice, aşa cum se poate constata după administrarea de adrenalină[991]. Rămîne deci ca un subiect de investigaţii viitoare problema în ce măsură leziunile de ateroscleroză apar mai frecvent şi evoluează mai grav în zonele intimei cu cea mai mare alterare a homeostaziei locale. Importanţa dezechilibrului între aportul nutritiv şi activitatea metabolică va apărea şi mai clar din rîndurile ce urmează.

Investigaţiile histoenzimologice au demonstrat, în primul rînd, că în peretele arterial cu o susceptibilitate crescută la ateroscleroză se poate evidenţia o reducere importantă a activităţii enzimelor ciclului Krebs [1218]. Sediul acestor fermenţi ar fi celula musculară netedă din intimă şi medie. Toate alterările de vîrstă şi patologice ale metabolismului celular se răsfrîng asupra organizării macromoleculare a substanţei fundamentale, fibrelor elastice, colagene şi reticulinice. Pe baza unor observaţii experimentale şi a unor constatări efectuate pe material uman, ar rezulta că la injurii foarte variate, de la factori infecţioşi la hipertensiunea arterială, aceste celule răspund stereotip prin reducerea activităţii enzimelor din ciclul Krebs. Tot în acelaşi mod răspund şi atunci cînd o creştere exagerată a grosimii intimei reduce aportul local de oxigen, creînd o stare prelungită de hipoxie.

Se ajunge astfel la utilizarea exagerată a glicolizei anaerobe pentru nevoile energetice, acest proces părînd să fie caracteristic zonelor arteriale cu susceptibilitatea maximă la ateroscleroză. Prin reducerea activităţii unor enzime din ciclul Krebs sînt diminuate respiraţia şi fosforilarea oxidativă, scăzînd în acelaşi timp şi producerea de legături fosfat, bogate în energie. Ca urmare, coboară foarte mult şi nivelul proceselor de sinteză proteică, incluzînd şi enzimele necesare metabolismului local. Este util, de asemenea, să amintim diminuarea capacităţii de sinteză a fosfolipidelor, rezultînd o insuficienţă a mecanismelor prin care peretele arterial menţine homeostazia intimei în condiţiile trecerii colesterolului sanguin dinspre lumen spre adventice. Prezenţa acestui cerc vicios alterează progresiv capacitatea de adaptare a peretelui arterial la variaţiile filtrării transintimale, favorizînd precipitări şi acumulări locale ale unor substanţe care, în condiţii fiziologice, traversează nealterate intima arterelor.

Cercetările histochimice în studiul susceptibilităţii peretelui arterial la ateroscleroză nu au dus la rezultate concludente pe baza utilizării metodelor de evidenţiere a diferitelor tipuri de glucide, protide, lipide, pigmenţi sau constituenţi anorganic. Au apărut însă perspective interesante de studiu în investigaţiile în care am folosit metodologia personală de testare a stabilităţii structurale a biopolimerilor [1107]. Utilizînd această metodologie, am putut demonstra următoarele [1109]: *a*) Stabilitatea structurală a macromoleculelor mucoproteinelor din intima aortei apare similară la nivelul crosei şi peretelui anterior al segmentului toracic, dar descreşte de la peretele anterior al segmentului toracic spre porţiunea abdominală a aortei. Gradul de stabilitate structurală diminuă, de asemenea, de la peretele anterior, spre cel posterior al segmentului toracic (*fig. 59*) şi de la regiunea dintre emergenţele intercostalelor, spre zona de emergenţă. Nu s-au constatat diferenţe semnificative între convexitatea şi concavitatea crosei, sau între peretele anterior şi posterior al aortei abdominale. *b*) Gradul de stabilitate structurală a macromoleculelor glicoproteinelor din intimă ce alcătuiesc fibrele de reticulină a fost găsit similar între crosă şi peretele anterior al segmentului toracic al aortei, dar a diminuat de la peretele anterior al segmentului toracic, spre peretele anterior al segmentului abdominal (*fig. 60*). Stabilitatea structurală diminuă de la peretele anterior, spre cel posterior al segmentului toracic şi de la zonele dintre emergenţe, către punctul de emergenţă a intercostatelor. Nu s-au evidenţiat diferenţe semnificative între convexitatea şi concavitatea crosei aceleiaşi aorte, sau între peretele anterior şi posterior ale aceluiaşi segment abdominal. *c*) Stabilitatea structurală a fibrelor de colagen din intimă descreşte, de asemenea, de la peretele anterior al segmentului toracic, spre cel anterior al segmentului abdominal (*fig. 61*). Ea diminuă şi de la peretele anterior spre cel posterior al aceleiaşi aorte toracice, ca şi de la zonele dintre emergenţe, spre emergenţa intercostalelor. Nu s-au obţinut diferenţe semnificative între crosă şi peretele anterior al aortei toracice, între concavitatea şi convexitatea aceleiaşi crose şi între peretele anterior şi posterior al aceluiaşi segment abdominal.

Scanned with OKEN Scanner

În rezumat, stabilitatea structurală a macromoleculelor substanței fundamentale, a fibrelor reticulinice și colagene, diminuă în aortă astfel: segmentul toracic → segmentul abdominal; peretele anterior → peretele posterior al aceluiași segment toracic; zonele dintre emergență → emergența intercostalelor [1109]. Datele rezultate din analiza noastră histochimică demonstrează că zonele din aortă cunoscute a avea cea mai mare susceptibilitate la ateroscleroză (aorta abdominală, peretele posterior al segmentului toracic, locurile de emergență a intercostalelor), prezintă: 1) o dizolvare mai rapidă a complexelor macromoleculare mucoprotidice în soluții ce rup legături electrostatice și covalente; 2) solubilizare mai rapidă în soluții hipertonice a fracțiilor hexozice ale reticulinei; 3) o solubilitate mai mare, în special în soluții de substanțe ce desfac punți de hidrogen, a fibrelor de colagen din intimă. În limita posibilităților de apreciere pe baza observațiilor microscopice, se poate susține că substanțele de tip heparinic și alte mucopolizaharide acide, precum și macromoleculele de colagen sînt mai rapid degradate în zonele cunoscute ca susceptibile la ateroscleroză, în comparație cu zonele mai puțin susceptibile. Astfel, la acțiunea hidrolitică a unui ferment eliberat din lizozomi sau elaborat de microorganisme, se va ajunge mai repede la alterarea organizării macromoleculare a țesutului conjunctiv, mergînd pînă la aspectele de necroză, în zonele unde există această hipostabilitate structurală „fiziologică", evidențiată de cercetările noastre. De asemeni, edemul, acționînd ca un agent lent de rupere a legăturilor electrostatice, va produce efecte degradante mai rapide și mai intense în zonele cu o anumită penurie a legăturilor dintre complexele macromoleculare constitutive ale intimei.

Datele biochimice sînt în mare parte corelate tot cu studiul mucopolizaharidelor, căutîndu-se să se evidențieze un patern „tînăr" și un patern „bătrîn" al acestor substanțe. Considerîndu-se că o anumită cantitate de acid hialuronic ar caracteriza paternul „tînăr", și o anumită cantitate paternul "bătrîn", s-a ajuns la concluzia că ateroscleroza apare în special în acele segmente vasculare unde există tipul „bătrîn" al paternului arterial al mucopolizaharidelor [368,773]. Tot pe baza unor determinări cantitative, s-a afirmat că susceptibilitatea la ateroscleroză a anumitor animale poate fi atribuită bogăției în mucopolizaharide a peretelui lor arterial, iar rezistența la ateroscleroză, lipsei acestor substanțe [919]. În legătură cu aceste rezultate ne mulțumim doar să reamintim că unele mucopolizaharide acide, cum ar fi substanțele heparinice, acționează ca agenți antiaterogeni prin proprietățile antilipemice și anticoagulante.

Un alt factor implicat în procesul de susceptibilitate ar fi cantitatea de colagen și de elastină din segmentul vascular respectiv. Raportul elastină /colagen este de 3,2 în arcul aortei, puțin susceptibil la ateroscleroză, și numai 0,2 în segmentul abdominal, intens susceptibil [413]. Se sugerează că marea capacitate de distensie a crosei, datorită bogăției în țesut elastic, o ferește de microtraumatismul ritmic al undei pulsatile, pe cînd segmentul

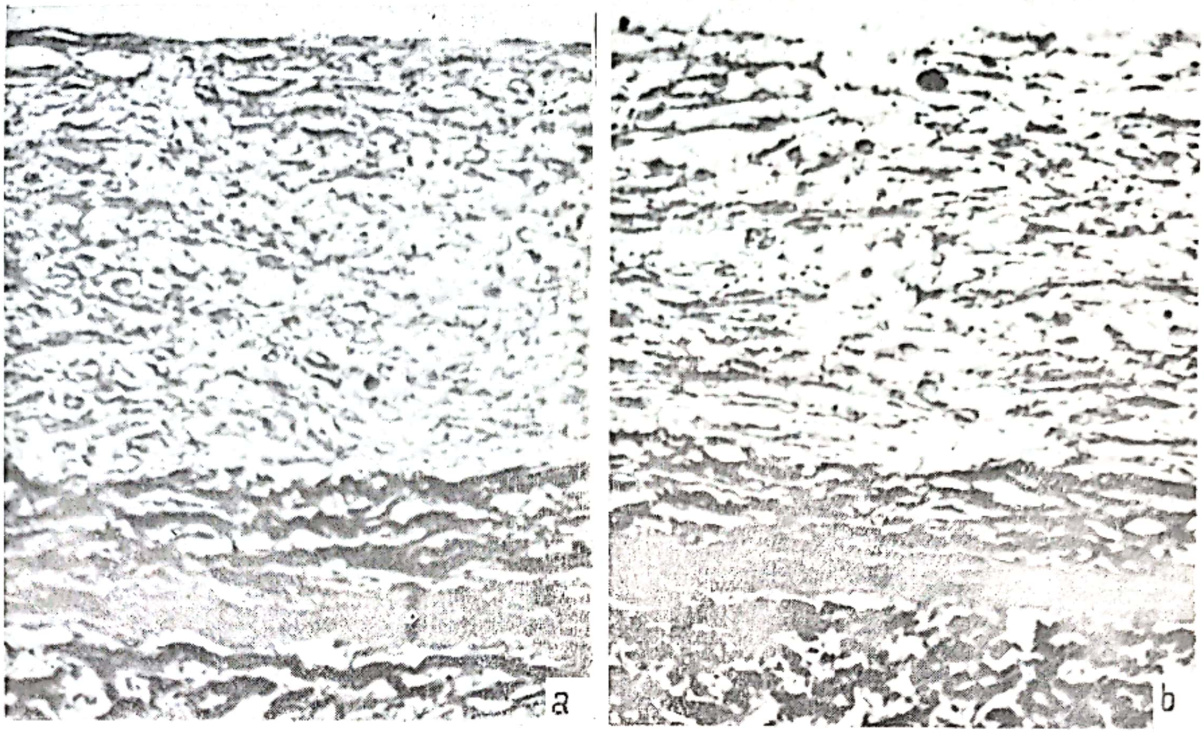


Fig. 59. Aortă de adult, fragment nefixat, supus la incubaţie cu ser fiziologic. a) Perete anterior al segmentului toracic; substanţa fundamentală a persistat după extracţie. b) Perete posterior al aceluiaşi segment toracic: substanţa fundamentală din intimă a fost în mare parte eliminată (VELICAN C.[1109], reprodus cu permisiunea editurii Elsevier).

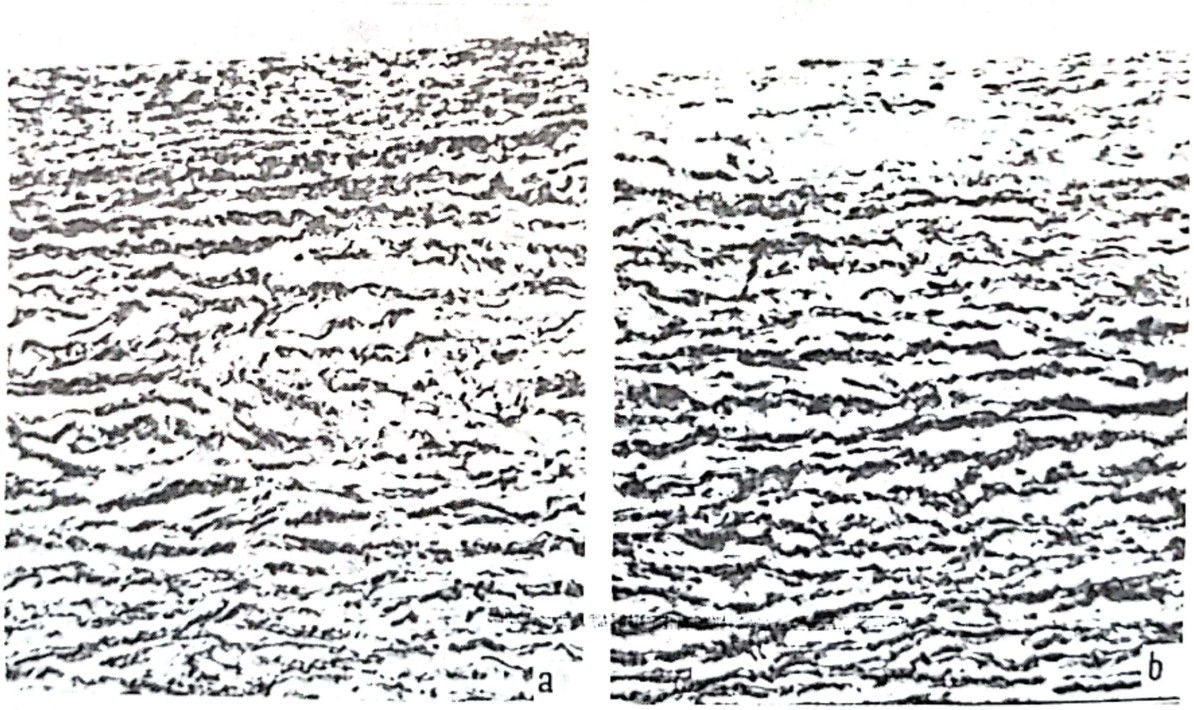


Fig. 60. Aortă de adult, fragment nefixat, supus la incubaţie cu NaCl 10%. a) Perete anterior al segmentului toracic: reţeaua argintofilă a rezistat extracţiei. b) Perete posterior al aceluiaşi segment toracic: reţeaua argintofilă din intimă a fost în mare parte solubilizată (VELICAN C.[1109], reprodus cu permisiunea editurii Elsevier).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 61. Aortă de adult, fragment nefixat, supus la incubaţie cu uree. a) Perete anterior al segmentului toracic: materialul fucsinofilic din fibrele de colagen a rezistat extracţiei; b) Peretele posterior al aceluiaşi segment toracic: materialul fucsinofilic din intimă a fost în mare parte degradat (VELICAN C.[1109], reprodus cu permisiunea editurii Elsevier).

Scanned with OKEN Scanner

abdominal, mai rigid din cauza diminuării ţesutului elastic şi creşterii colagenului, ar fi mai intens stresat.

★

Din datele prezentate şi care sînt departe de a epuiza subiectul tratat, începe să se evidenţieze acţiunea intricată a unor factori, tot mai numeroşi şi mai diverşi, în determinarea susceptibilităţii la ateroscleroză a anumitor vase şi segmente vasculare. Intervin în acest sens :

— reduceri ale presiunii laterale exercitate de fluxul sanguin, rezultînd un proces de „sucţiune" a intimei, cu formarea neordonată a unui ţesut conjunctiv imatur, a cărui prezenţă modifică permeabilitatea locală ;

— intensificări ale stress-urilor exercitate de fluxul sanguin, determinînd rupturi ale lamelor elastice, urmate de procese reparatoare, în parte neadecvate, care, de asemenea, alterează permeabilitatea locală ;

— îngroşarea considerabilă a intimei, cu dereglarea echilibrului între aportul nutritiv şi necesităţile metabolice, favorizînd apariţia de edem, stază şi necroză, toate alterînd mai mult sau mai puţin grav permeabilitatea locală ;

— diminuarea proceselor oxidative şi a celor de sinteză, cu reducerea potenţialului enzimatic, a capacităţii de solubilizare a lipidelor şi a elaborării de mucopolizaharide cu acţiune anticoagulantă şi antilipemică ;

— existenţa unui grad redus de stabilitate structurală a complexelor macromoleculare în ţesutul conjunctiv al intimelor îngroşate, favorizînd o degradare mai rapidă şi mai intensă a substanţei fundamentale şi a fibrelor sub acţiunea factorilor chimici şi enzimatici ;

— prezenţa unui patern special biochimic, caracterizat prin abundenţa condroitin-sulfaţilor şi a colagenului şi prin reducerea ţesutului elastic.

Este încă foarte greu de precizat ponderea fiecăruia dintre aceşti factori în determinarea susceptibilităţii la ateroscleroză, după cum rămîne încă îndoielnic dacă aceştia sînt într-adevăr agenţii principali, sau sînt numai cei pe care îi cunoaştem pînă acum. De aceea, orice încercare de a unilateraliza problema este la fel de nedorită ca şi încercările de generalizare, care ignorează particularităţile de specie şi de condiţii experimentale.

ROLUL MUCOPOLIZAHARIDELOR ACIDE

Ultimul subiect privind rolul alterărilor în organizarea macromoleculară a peretelui arterial în patogenia aterosclerozei, va fi limitat la *studiul mucopolizaharidelor acide.*

Observaţii privind creşterea substanţelor mucoide în zona subendotelială a arterelor mari, datează de un secol. Identificarea ulterioară a mucopolizaharidelor acide în acest material metacromatic a impus cercetarea corelaţiei între apariţia aterosclerozei şi modificările cantitative şi calitative ale acestor substanţe. Studiile topochimice au dus la rezultate contradictorii, anumiţi autori susţinînd că lipidele se depun acolo unde există acumulări de mucopolizaharide acide [28], alţii infirmînd această interrelaţie [1225]. Cît priveşte aprecierile cantitative, metodele histochimice nu

Scanned with OKEN Scanner

au permis decît prezentarea unor date semi-cantitative, lăsînd biochimiştilor sarcina rezolvării acestei probleme. Analiza biochimică a mucopolizaharidelor din focarele de ateroscleroză a prilejuit multor autori să susţină o creştere netă a cantităţii globale a acestor substanţe. Astfel, de exemplu, condroitin-sulfaţii prezintă valori ce se ridică de la 47, 3 la 63%, heparitin-sulfatul de la 1,6 la 2,1%, keratosulfatul de la 22,2 la 27,4%; în schimb acidul hialuronic scade de la 5,2 la 1,3% şi condroitinul de la 15,2 la 2,1%[169]. Raportîndu-se datele biochimice la aspectul microscopic al leziunilor, s-a constatat că cea mai mare cantitate de heparitin-sulfat ar exista în primul stadiu de dezvoltare a aterosclerozei, în timp ce condroitin-sulfaţii devin predominanţi în stadiul al doilea. Astfel, evoluţia ateromului este caracterizată prin diminuarea heparitin-sulfatului şi creşterea condroitin-sulfaţilor A şi C[580]. Nu s-au constatat variaţii semnificative ale condroitin-sulfatului B. În afara măririi ritmului de sinteză a anumitor tipuri de mucopolizaharide, au fost evidenţiate şi potenţări ale catabolismului, reflectate în special prin activitatea mărită a unor enzime de tip lizozomial, cum ar fi beta-glucuronidaza, beta-glucozaminidaza, hialuronidaza, etc.[861]. Nu intrăm în numeroasele discuţii contradictorii privind existenţa sau neexistenţa unor modificări cantitative sau calitative ale mucopolizaharidelor acide, legate de apariţia şi dezvoltarea aterosclerozei. Trebuie subliniat faptul că analiza biochimică nu se face pe un vas în întregime, ci pe fragmente mici în care există sau nu există leziuni, sau în care leziunile au grade diferite de evoluţie. Astfel, variabilitatea condiţiilor de prelevare, asociată cu dinamica modificărilor din peretele arterial, pot ajuta să înţelegem aparenta „divergenţă" a rezultatelor din analiza mucopolizaharidelor acide în focarele de ateroscleroză. Nu trebuie uitate nici greutăţile de a extrage totalitatea acestor substanţe şi de a rupe legăturile cu proteinele într-un ţesut cu multă scleroză, greutăţi pe care chimiştii nu ezită să le menţioneze[579]. De aceea, fiecare investigaţie reflectă particularităţile materialului asupra căruia s-a lucrat şi ale condiţiilor de lucru respective. Fără a deveni sclavii cifrelor şi ai procentelor, trebuie să încercăm să corelăm datele cantitative furnizate de biochimişti, cu analizele histochimice. În rîndurile care urmează vom prezenta mai amănunţit rezultatele analizelor histochimice, discutate ulterior în lumina cunoştinţelor actuale de fiziopatologie.

Analize histochimice. Cercetările noastre au încercat să evidenţieze dacă există un patern special de reactivitate histochimică a mucopolizaharidelor, care ar putea fi corelat cu patogenia aterosclerozei, anumite orizonturi în acest domeniu fiind deschise de investigaţiile anterioare ale altor autori[120, 158, 1223, 1224]. Astfel, am putut evidenţia:

a) Localizarea predominant subendotelială a mucopolizaharidelor de tip heparinic, cunoscute prin acţiunea lor antilipemică şi anticoagulantă. Dimpotrivă, mucopolizaharidele acide de tipul acidului hialuronic şi condroitin-sulfaţilor, precum şi acidul sialic, se localizează predominant în zona profundă a intimei, în vecinătatea imediată a mediei. Această diferenţă histochimică este mai netă la copil, faţă de adult şi la adult, faţă de bătrîn, diminuînd cu cît creşte frecvenţa apariţiei leziunilor de ateroscleroză.

Scanned with OKEN Scanner

În acelaşi timp am constatat că aceiaşi zonă subendotelială bogată în substanţe de tip heparinic prezintă un număr mai mare de grupări electronegative libere, în comparaţie cu zona profundă a intimei. Drept urmare apar mai intense coloraţiile cu albastru de toluidină, safranină, roşu neutru, aldehid-fucsina Gabe, pironină, fier coloidal. Dimpotrivă albastrul alcian, care evidenţiază destul de selectiv acidul sialic, este deseori mai intens în regiunea profundă a intimei.

b) Existenţa în intimă a unei reactivităţi histochimice de tipul grupelor carboxilice, deşi din punct de vedere biochimic s-au dozat mari cantităţi de grupe sulfat aparţinînd condroitin-sulfaţilor, substanţelor heparinice şi keratosulfatului. Astfel, analizele noastre histochimice demonstrează că grupele sulfat sînt blocate în cadrul complexelor macromoleculare respective şi nu ar participa la crearea zonei de permeabilitate selectivă a intimei [1104]. Blocarea grupelor sulfat de către proteine se intensifică în fazele premergătoare apariţiei aterosclerozei, apoi urmează procese de degradare a complexelor mucoprotidice [383]. Complexele mucoprotidice trec, probabil, în mod succesiv, prin stadii de hiper- şi hipostabilitate structurală, primele favorizînd dezvoltarea sclerozei, ultimele acumularea de lipide şi de fibrinogen.

c) Existenţa în intimă a unor complexe macromoleculare mucoprotidice şi sialo-mucoprotidice, susceptibile la digestia cu papaină [1104]. Acţiunea proteolitică a papainei a constituit, în cercetările noastre, singurul mijloc de a înlătura complet tot materialul metacromatic din peretele arterial (*fig. 62*). Alţi autori menţionează posibilitatea hidrolizei enzimatice a aceluiaşi material, utilizînd o digestie enzimatică complexă conţind o mixtură de *F. heparinum* adaptat pentru condroitin-sulfaţi şi heparitin-sulfat [1223].

d) Existenţa unei diferenţe nete între stabilitatea structurală a aceloraşi complexe macromoleculare din intimă şi medie. Atît materialul metacromatic, cît şi fibrele reticulinice şi de colagen ale intimei, s-au dovedit a fi mai uşor degradate prin extracţii enzimatice sau chimice, în comparaţie cu structurile similare din media aceluiaşi fragment de arteră, aşa cum s-a putut constata din tabelurile VI, VII şi VIII.

În paginile anterioare am demonstrat că în segmentele aortei există o diferenţă netă între stabilitatea structurală a diferitelor zone, stabilitatea fiind mult redusă în teritoriile cunoscute că ar prezenta susceptibilitatea cea mai mare la ateroscleroză. Analizele menţionate demonstrează în plus că, în mod global, intima arterelor păstrează caracterul unui ţesut conjunctiv mai puţin matur, atunci cînd este comparată cu media aceluiaşi vas. Această relativă imaturitate îi permite un grad mai mare de plasticitate, o mai mare uşurinţă în a fi modelată prin acţiuni hormonale, enzimatice, procese de oxido-reducere etc. [1109,1110].

e) Existenţa unui caracter de discontinuitate în procesul de acumulare subendotelială a mucopolizaharidelor. El apare adesea sub aspectul unei succesiuni în lungul axului longitudinal al arterei, a unor zone de acumulare a mucopolizaharidelor mai întîi în citoplasma celulelor endoteliale, apoi a unor zone de acumulare subendotelială şi, însfîrşit, a unor zone su-

Scanned with OKEN Scanner

gerînd difuzarea materialului metacromatic sintetizat de celulele endoteliale, în toată grosimea intimei [1097,1101]. Ca urmare a acestor observaţii, am emis ipoteza existenţei de cicluri secretorii ale celulelor endoteliale şi a existenţei unei „segmentări metablice" a peretelui arterial.

Consideraţii fizio-patologice. Experienţa noastră în acest domeniu ne permite să sugerăm că rolul mucopolizaharidelor acide în patogenia aterosclerozei poate fi corelat cu :

— modificările de permeabilitate ale intimei ;
— viteza trecerii prin intimă a fibrinogenului şi lipidelor ;
— integritatea structurală şi funcţională a fibrelor reticulinice, colagene şi elastice ;
— dinamica fibrilogenezei colagene.

I. Se presupune că, la om, nutriţia transendotelială se exercită pe o profunzime de aproximativ 0,5 mm la nivelul aortei, şi de aproximativ 0,37 mm, la nivelul coronarelor [374]. În această zonă de nutriţie transendotelială, ţesutul conjunctiv rămîne cu o organizare macromoleculară de tip embrionar, reflectată de persistenţa acidului hialuronic şi a fibrelor reticulinice şi de absenţa formării fibrelor de colagen. Inexistenţa unei membrane bazale sub stratul de celule endoteliale, caracteristică numai vaselor mari, conferă ţesutului conjunctiv subintimal rolul de barieră semipermeabilă. La copil în special, acidul hialuronic formează geluri hidrofile şi asigură sarcina electronegativă adecvată. La adult, predomină substanţele de tip heparinic, probabil heparitin-sulfatul. S-a constatat că la nivelul vaselor, acidul hialuronic este mai slab polimerizat ca în alte organe, această hipostabilitate structurală permiţînd un grad mai mare de permeabilitate, chiar pentru molecule cu dimensiuni importante. Astfel, trecerea prin difuziune (influenţată de variaţiile presiunei intralumenale), cît şi trecerea prin filtrare (cu participarea activă a celulelor endoteliale) sînt ulterior reglate de cantitatea, gradul de polimerizare şi numărul de grupări reactive libere ale mucopolizaharidelor acide din intimă, asigurînd *clearance*-ul peretelui vascular. Toţi factorii care diminuă stabilitatea structurală, hidrolizînd acidul hialuronic, favorizează dezvoltarea mai rapidă a aterosclerozei experimentale [556,685,982]. Dimpotrivă, toţi factorii care inhibă procesul de depolimerizare, întîrzie sau împiedică apariţia leziunilor [982,1150]. S-a putut deci demonstra că la acelaşi nivel al lipidelor serice, morfogeneza aterosclerozei experimentale poate fi influenţată de gradul de polimerizare a mucopolizaharidelor din substanţa fundamentală a intimei. Nu trebuie omis faptul că la om hialuronidazele streptococice pot exercita acţiunea lor hidrolizantă, că există factori ce pot elibera hidrolaze lizozomale în peretele arterial, că, de asemenea, iradiaţiile, în anumite doze, desfac legăturile dintre macromoleculele de acid hialuronic, că însăşi vitamina C, în doze mari, poate depolimeriza mucopolizaharidul prin procese de oxido-reducere. Este de presupus că un mare număr de agenţi sînt capabili, mai ales în condiţii patologice, să creeze în intima vasului o stare de hipostabilitate structurală nefiziologică, rezultînd creşterea permeabilităţii transintimale, asociată cu dispariţia substanţei fundamentale orientată pentru trecerea „ordonată" a lipidelor şi fibrinogenului.

Scanned with OKEN Scanner

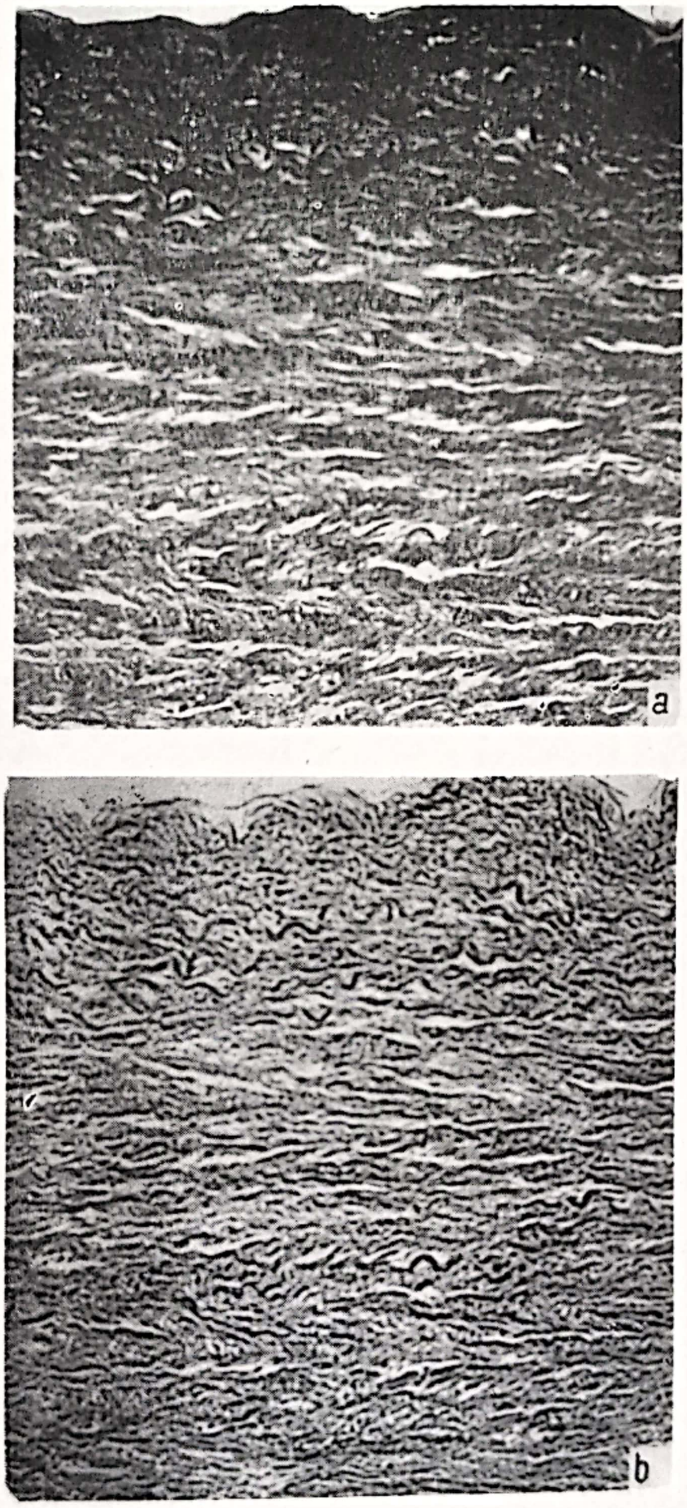


Fig. 62. Aortă de adult. a) Coloraţie cu albastru de toluidină. b) Coloraţie cu albastru de toluidină după digestie cu papainã. Eliminarea totală a mucoproteinelor ce dădeau reacţie metacromatică sau bazofilie (VELICAN C.[1104], reprodus cu permisiunea editurii Elsevier).

Scanned with OKEN Scanner

II. În condiţii fiziologice, în prezenţa substanţelor heparinice, a unui factor plasmatic ce se găseşte în fracţia a IV-a a lui Cohn şi a unui factor tisular, ia naştere lipoprotein-lipaza. Acest complex protidic cu acţiune clarifiantă, catalizează catabolismul lipidelor şi, mai ales, al trigliceridelor, mărind considerabil gradul de dispersie a lipoproteinelor. În lumina cercetărilor noastre topochimice, se poate atribui zonei subendoteliale a arterelor, capacitatea cea mai mare de a stimula geneza lipoproteinlipazei, întru cît la acest nivel apare concentrarea maximă de substanţe heparinice. Cercetări experimentale au demonstrat că efectul sclerogen al colesterolului pare cu atît mai puţin net, cu cît substanţa este mai mult dispersată; dimpotrivă, acest efect se accentuează cu cît colesterolul se găseşte în cantitate mai mare sub formă cristalină [10]. S-a mai constatat că esterii de colesterol emulsionaţi sînt inactivi asupra ţesutului conjunctiv, iar cei neemulsionaţi devin sclerogeni. Prezenţa acizilor graşi nesaturaţi potenţează eliminarea colesterolului din peretele arterial, cei mai uşor rezorbabili părînd a fi esterii de colesterol cis-polinesaturaţi [3]. Aceşti esteri au o structură macromoleculară laxă care permite pătrunderea apei şi a enzimelor de tipul lipoprotein-lipazei în vecinătatea macromoleculei. Observaţiile experimentale asupra rolului antilipemic al heparinei au sugerat şi încercări de terapeutică, notîndu-se adesea rezultate încurajatoare [305].

Prezenţa acumulărilor subendoteliale de substanţe heparinice poate fi corelată şi cu proprietăţile anticoagulante ale peretelui vascular. Într-un extract de perete conţinînd 12,5% grupe sulfat, 24,2% hexoze şi hexozamine (80% galactozamină şi 20% glucozamină) şi 35% acizi uronici [572], activitatea anticoagulantă a fost mai slabă decît cea exercitată de o soluţie de 1% de heparină comercială. Ea diminuă atît cu înaintarea în vîrstă, cît mai ales cu apariţia leziunilor de ateroscleroză. Raportată la întregul sistem circulator, ar reprezenta, în fiecare moment, echivalentul introducerii a 5 mg de heparină comercială [394]. S-a constatat că atîta timp cît acumulările subendoteliale de mucopolizaharide de tip heparinic persistă, nu apar tromboze, chiar dacă endoteliul este denudat [394]. Observaţii personale ne-au permis să constatăm absenţa trombozelor, atîta timp cît celulele endoteliale sintetizează substanţe de tip heparinic care se acumulează subendotelial, şi prezenţa trombozelor, cînd această sinteză este inhibată [1097, 1131]. Faptul că numeroase lucrări menţionează eficacitatea tratamentului cu heparină pentru prevenirea trombozelor distale şi retrograde ale arterelor, a trombozelor murale, a emboliză-rilor sistemice, a tromboflebitei canceroase, precum şi a pericolului unei embolii pulmonare, impune să se ia mai adînc în considerare rolul pe care îl joacă, în mod permanent, din acest punct de vedere, substanţele de tip heparinic sintetizate de endoteliul vascular. Se acceptă astăzi că heparina inhibă elaborarea tromboplastinei şi transformarea protrombinei în trombină. Rolul său apare important în special în primul stadiu al procesului de coagulare, cînd are loc formarea trombinei şi interacţiunea trombină-fibrinogen, necesară apariţiei fibrinei. Trebuie, de asemenea, reamintit că heparina împiedică aglomerarea trombocitelor, ca şi polimerizarea fibrinogenului. S-a sugerat că, în mod fiziologic, ar avea loc

Scanned with OKEN Scanner

formarea de filme de fibrină la suprafaţa endoteliilor vasculare, intensitatea acestui proces fiind reglată de o sinteză adecvată de substanţe heparinice. Cînd această sinteză devine deficitară, filmul de fibrină se îngroaşe, acumulează şi plachete şi ia, treptat, aspect de microtrombus. Ulterior, endoteliul acoperă trombusul şi la suprafaţa vasului au loc alte acumulări urmate de noi procese de încorporare, realizînd aspectul de „stratificare geologică" a intimei arterelor mari, descrisă de vechii anatomo-patologi. Anumiţi autori consideră că acest proces de continuă inclavare a microtrombusurilor în intima arterelor, ar constitui un factor mult mai important în apariţia aterosclerozei decît depunerile de lipide. În afara acţiunii antitrombotice a substanţelor de tip heparinic, considerată ca o particularitate a tipului de organizare macromoleculară a peretelui vascular [771], în zona subendotelială se mai exercită şi acţiuni fibrinolitice. Intensitatea lor depinde de conţinutul lizozomilor celulelor locale în activator al plasminogenului, capabil să convertească plasminogenul sanguin în plasmină [647]. Activitatea fibrinolitică a fost găsită de anumiţi autori mai mare în aortă, în comparaţie cu coronarele şi mai mare în coronare, în comparaţie cu bazilara; alţi autori susţin că arterele de tip muscular ar avea, în general, o capacitate fibrinolitică mai intensă, decît cele de tip elastic. Este greu de corelat aceste observaţii cu modificările întîlnite în cursul aterosclerozei, întru cît nu ştim cum se exercită capacitatea fibrinolitică în zonele unde se vor dezvolta leziunile. Ca o remarcă generală putem afirma că în arterele de tip elastic predomină acumulările de lipide, iar în cele de tip muscular, acumulările de fibrinogen.

Mucopolizaharidele din peretele arterial ar mai putea constitui şi sediul formării unor complexe macromoleculare cu fibrinogenul şi beta-lipoproteinele, favorizînd astfel apariţia aterosclerozei. Nu este vorba însă de mucopolizaharide normale din punctul de vedere al proprietăţilor fizico-chimice şi biologice, ci de substanţe care ar fi „alterate", în special ca urmare a procesului de hipoxie prelungită [376,377]. În lumina acestei ipoteze se afirmă că dezvoltarea, atît a aterosclerozei umane, cît şi a celei experimentale, nu este determinată de acumulările de lipide, ci de alterările în compoziţia variatelor mucopolizaharide şi ale proprietăţilor fizico-chimice ale acestor substanţe, procesul de acumulare lipidică fiind secundar acestor alterări. *In vitro*, s-au putut crea complexe macromoleculare patologice între mucopolizaharide acide sulfatate, fibrinogen şi beta-lipoproteine; *in vivo*, existenţa acestor complexe este doar sugerată. Date histoautoradiografice demonstrează că dacă animalele sînt supuse la o dietă bogată în colesterol, apare o creştere a sintezei mucopolizaharidelor sulfatate, înainte ca lipidele să înceapă să se acumuleze în artere [338]. O sinteză crescută a fost constatată şi după administrarea unor produşi ce nu se acumulează în pereţii vasculari, cum ar fi substanţe medicamentoase, toxine bacteriene, alergeni etc. [467], fiind considerată ca o reacţie „nespecifică" a mezenchimului [470].

III. Nu vom insista asupra rolului mucopolizaharidelor din peretele vascular în menţinerea integrităţii structurale şi funcţionale a substanţei

Scanned with OKEN Scanner

fundamentale şi a fibrelor reticulinice şi colagenice, întrucît am fi obligaţi să repetăm datele cu caracter general, prezentate în primele 2 capitole. Reamintim numai că fracţiile glucidice joacă un rol important în stabilitatea structurală a ţesutului elastic, demonstrîndu-se că elastomucoproteinaza eliberează din fibre o lipomucoproteină conţinînd acid sialic [72] şi că o altă fracţie glucidică denumită convenţional „mucoid 1" ar juca rolul de ciment în asigurarea coeziunei interfibrilare [65]. În ceea ce priveşte procesul de fibrilogeneză colagenă, el apare în artere sub trei aspecte principale : a) de adaptare fiziologică, întărind segmentele arteriale supuse la presiuni hidrostatice mai mari exercitate dinspre lumen (deschideri de colaterale, bifurcaţii, crose); b) de adaptare nefiziologică, înlocuind elementele elastice alterate; c) de cicatrizare, organizînd focarele exsudative, hemoragice şi necrotice din plăcile cu ateroscleroză.

*

În lumina datelor prezentate, dezvoltarea aterosclerozei pare a fi favorizată de toţi factorii care :

— reduc cantitativ sau/şi modifică calitativ mucopolizaharidele din intimă, alterînd astfel permeabilitatea selectivă şi organizarea spaţial ordonată a substanţei fundamentale, adecvată trecerii transintimale a constituenţilor plasmatici;

— diminuă mucopolizaharidele de tip heparinic din zona subendotelială, favorizînd acumulările de lipide şi de fibrinogen, ca urmare a dispariţiei acţiunilor antilipemice şi antitrombotice, exercitate în mod fiziologic de aceste substanţe;

— măresc cantitatea de mucopolizaharide de tipul condroitinsulfaţilor, care potenţează fibrilogeneza colagenă, creind, la zona de graniţă dintre intimă şi medie, un obstacol alcătuit din ţesut de fibroză, ce se opune trecerii constituenţilor plasmatici cu molecule mai mari.

Această schematizare, limitată doar la rolul mucopolizaharidelor, este însă departe de a sugera toată complexitatea mecanismelor care pregătesc, favorizează sau determină apariţia şi evoluţia aterosclerozei.

Din datele prezentate privind importanţa alterărilor în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv al intimei arterelor în etiopatogenia aterosclerozei, lipsesc rezultatele studiilor efectuate asupra ţesutului elastic, fibrelor colagene şi anumitor complexe glicoprotidice. Această absenţă este justificată de faptul că modificările structurilor menţionate, descrise în cursul apariţiei şi dezvoltării aterosclerozei, nu pot fi clar separate de cele evidenţiate în timpul perioadei de „îmbătrînire" a vaselor, larg dezvoltate în capitolul anterior.

HIPERTENSIUNEA ARTERIALĂ

Rolul membranelor bazale din glomerulii renali

În hipertensiunea arterială, afecţiune cu o morbiditate extrem de largă, reprezentînd probabil şi principalul factor de risc în ateroscleroză, cele mai importante alterări în organizarea macromoleculară a ţesutului

conjunctiv privesc arteriolele şi membranele bazale din glomerulii renali. În rîndurile care urmează, vom insista foarte puţin asupra modificărilor din pereţii vasculari, fiind vorba de procese de îngroşare a intimei, de fragmentări ale fibrelor elastice, de neoformări de fibre colagene şi de acumulări de substanţă fundamentală, similare celor descrise atît în capitolul privind modificările în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv determinate de înaintarea în vîrstă, cît şi în subcapitolul anterior asupra aterosclerozei. De asemenea, nu vom mai repeta anumite date cu caracter general privind histogeneza fibrinoidului, hialinului şi amiloidului, prezentate anterior. Principalul subiect de analiză îl va constitui membrana bazală a glomerulilor renali.

Membrana bazală a glomerulilor renali reprezintă singura structură de acest tip care a putut fi izolată, purificată şi investigată cu metode moderne de cercetare. Ele au permis să se demonstreze existenţa anumitor particularităţi fizico-chimice şi biochimice. Una dintre particularităţile biochimice o constituie prezenţa, în mare cantitate, a colagenului, deşi nici microscopia electronică, nici studiile la lumină polarizată sau metodele histochimice, nu au sugerat această prezenţă. Anumite rezultate atrag atenţia că, după digestie cu colagenază sau încălzire la 90° într-o soluţie cu pH neutru, aproximativ 1/2 din cantitatea de membrane glomerulare se transformă în fracţii dializabile şi că peste 90% din conţinutul în hidroxiprolină şi hidroxilizină devine solubil [646]. O altă caracteristică biochimică este raportul hidroxilizină/hidroxiprolină, care variază între 0,04 şi 0,13 în piele, tendon şi os [1072], în timp ce, în glomerul este de 0,34, indicînd existenţa unei cantităţi extrem de mari de hidroxilizină, în comparaţie cu alte teritorii conjunctive [646]. O altă particularitate pare a fi prezenţa macromoleculelor de colagen în complexe cu mici fracţii oligozaharidice, alcătuite din glucoză şi galactoză [250]. În afară de colagen şi de proteinele necolagene, membranele bazale glomerulare conţin numeroase glucide, responsabile atît de reactivitatea histochimică, cît şi de proprietăţile visco-elastice şi de permeabilitate selectivă. Menţionăm astfel că în membrana glomerulului „normal" există, la cîine, 5,52% hexoze, 1,4% hexozamine (mai ales glucozamină) 2,1% acid sialic şi 0,75% fucoză [565], la bovine s-au evidenţiat 2,25% glucoză, 3,1% galactoză, 0,77% manoză, 1,7% hexozamine, 1,2% acid sialic şi 0,22% fucoză [1023]. Este greu de precizat dacă diferenţele cantitative între variatele fracţii glucidice menţionate ţin de specia investigată sau de metodologia utilizată.

Datele de microscopie electronică nu sînt concordante nici în ceea ce priveşte grosimea membranei bazale glomerulare, nici în ceea ce priveşte textura sa ultrastructurală. Unele investigaţii mai amănunţite efectuate asupra grosimei, dau ca cifre medii 3 146 Å, cu deviaţia standard de 983 Å [820]. Se sugerează că limita superioară a normalului ar fi 5 112 Å, reprezentînd valoarea medie, plus două deviaţii standard; peste această limită s-ar putea vorbi de o îngroşare patologică. Subliniem că s-a mai constatat o anumită neregularitate de distribuţie a valorilor grosimei membranei bazale în cadrul aceluiaşi glomerul, pe care deviaţia standard nu o reflectă în mod satisfăcător. Vîrsta şi sexul nu au putut fi corelate,

Scanned with OKEN Scanner

la adult, cu variaţiile în grosime ale membranei bazale; de asemenea, nu au apărut modificări importante după ischemie prelungită sau administrare de alcool [820]. În afara texturii omogene a membranei bazale, descrisă de toţi cercetătorii ce au efectuat primele investigaţii electronomicroscopice, s-au mai individualizat şi două tipuri de componente fibrilare [317]: *a)* o reţea fibrilară alcătuită din elemente cu diametrul de 30—40 Å, evidenţiabilă în tot spaţiul dintre endoteliul şi epiteliul glomerular, după tratarea secţiunilor cu metale grele; *b)* fibrile cu diametrul de aproximativ 110 Å, lipsite de periodicitate, acumulate în spaţiul dintre endoteliu şi membrana bazală şi care apar strins lipite de celulele endoteliale. Prezenţa în cisternele reticulului endoplasmic (atît al celulelor epiteliale, cît şi al celor endoteliale) a unui material de secreţie cu densitatea structurală a membranei bazale, sugerează că aceste elemente ar elabora în continuu complexele macromoleculare necesare remodelării [825]. De aceea, ori ce factor care interferează cu metabolismul acestor celule, poate influenţa cantitativ şi calitativ paternul organizării macromoleculare a membranei glomerulare.

Existenţa unor discontinuităţi în lungul stratului de celule endoteliale şi epiteliale, fac din membrana bazală glomerulară singura structură continuă interpusă între sînge şi ultrafiltratul glomerular, constituind principalul factor implicat în procesul de filtrare renală. În legătură cu această importantă funcţie, trebuie menţionat că cercetările de microscopie electronică nu au confirmat existenţa de pori anatomici în grosimea membranei, aşa cum intuiau vechii histologi şi anatomo-patologi. Datele acumulate în acest domeniu tind să demonstreze că ar fi vorba de pori funcţionali, de o adaptare a complexelor macromoleculare la funcţia de filtru selectiv, prin care pot trece molecule avînd diametrul pînă la aproximativ 100 Å. Particulele de dimensiuni mai mari rămîn la suprafaţa membranei bazale acoperită de stratul de celule endoteliale, de unde sînt în parte eliminate prin procese de pinocitoză şi fagocitoză, exercitate de celulele endoteliale însăşi. S-a sugerat că porozitatea complexelor macromoleculare care alcătuiesc membrana bazală ar fi determinată, în primul rînd, de gradul conectării intermoleculare. Drept urmare, cu cît creşte numărul de legături dintre macromolecule, cu atît scade diametrul particulelor ce pot trece printre ele. Anumite comparaţii s-au făcut cu coloanele de „Sephadex", care separă speciile moleculare după dimensiunea moleculei respective, „Sephadexul" cu porozităţi mai mari fiind comparat cu membrana glomerulară din nefroze, iar cel cu porozităţi mai mici cu membrana bazală din hipertensiunea arterială malignă [509].

Din punctul de vedere al reactivităţii histochimice, reamintim intensa colorаţie cu PAS, datorită bogăţiei în hexoze, precum şi afinitatea redusă pentru coloranţi bazici de tipul albastrului de toluidină şi albastrului alcian. Materialul reactiv la coloranţi bazici dispare după digestie cu sialidază, indicînd acidul sialic ca substrat purtător de grupări acide. În cazurile studiate de noi, colorаţia cu albastru alcian a apărut mai intensă la copil, în comparaţie cu adultul, în timp ce reacţia PAS a fost constant mai intensă la adult decît la copil. Pe baza observaţiilor

Scanned with OKEN Scanner

de microscopie fotonică, nu am putut evidenţia modificări importante în organizarea macromoleculară a membranelor bazale după digestii cu hialuronidază testiculară şi lizozim, sau după incubaţii mai scurte cu fermenţi proteolitici, inclusiv colagenaza. Lipsa de susceptibilitate a substratului bazofil la acţiunea hialuronidazei este în concordanţă cu datele de biochimie care nu menţionează existenţa de mucopolizaharide acide în membrana bazală glomerulară, izolată şi purificată. Totuşi, anumite cercetări de microscopie electronică atrag atenţia că după administrarea parenterală a acestei enzime, membranele bazale glomerulare prezintă discontinuităţi şi fragmentări şi apar proteinurii [912]; aceste rezultate ar sugera o creştere a permeabilităţii, care ar putea rezulta din hidroliza unor mucopolizaharide acide, situate în lamina rara, denumire dată zonelor externe mai puţin dense ale membranei bazale, ce flanchează structura centrală denumită lamina densa.

Tot din punctul de vedere al reactivităţii histochimice ne-a atras atenţia şi absenţa impregnabilităţii membranelor bazale glomerulare la metoda Gomori, avînd ca agent oxidant MnO_4K, în timp ce structurile similare din teritoriile capilare ale altor organe (ficat, splină, plămîn, miocard etc.) apar intens impregnate. În schimb, nu se constată nici o deosebire dacă se folosesc metodele preconizate de Laidlaw sau de Jones, avînd ca agent oxidant acidul periodic (*fig. 63*). Această particularitate histologică, al cărei substrat stereochimic nu a fost încă evidenţiat, a constituit punctul de plecare a unor investigaţii personale[1141], menite să ajute la o mai bună înţelegere a fiziologiei şi, mai ales, a fiziopatologiei glomerulului. Dintre aceste rezultate, subliniem următoarele date mai importante :

a) Principala reactivitate histochimică a membranelor bazale din glomerulii renali „normali" de om este conferită de grupările hidroxil vicinale. Convertirea lor în aldehide, printr-un oxidant specific, acidul periodic, care rupe şi lanţul carbonic dintre grupările adiacente oxidate, permite evidenţierea membranelor bazale, atît prin metodele de impregnaţie argentică Laidlaw şi Jones, cît şi prin reacţia PAS şi coloraţia cu rezorcin-fucsină. Blocarea grupărilor hidroxil vicinale prin acetilare sau sulfatare, ca şi blocarea prin fenilhidrazină a aldehidelor vicinale rezultate din oxidare, a împiedicat vizualizarea membranelor bazale glomerulare.

b) Grupările hidroxil apar nereactive la agenţii ce acţionează prin oxidarea directă a hidroxililor în carbonili, fără ruperea lanţului carbonic (hipermanganat de potasiu, acid cromic etc.). De aceea, metoda Gomori devine eficientă, dacă oxidarea prin hipermanganat de potasiu este înlocuită prin acid periodic.

c) Metodele folosite în analizele noastre nu au evidenţiat în membranele bazale glomerulare funcţii aldehidice libere, aşa cum există, de exemplu, în pereţii sinusoidelor hepatice [1126, 1139]. Pe materialul nefixat şi nesupus unor tratamente prealabile, glomerulii nu apar impregnaţi direct de soluţiile de nitrat de argint, nici nu se colorează direct cu reactivul Schiff.

d) Grupele amino, sulfhidril şi disulfidice ale proteinelor nu par a juca un rol important ca sedii de impregnaţie argentică. Se remarcă însă o intensificare a impregnaţiei după pretratare cu acid tanic, care, prin

Scanned with OKEN Scanner

acţiune competitivă, ar putea elibera unele grupări hidroxil incluse în punţi de hidrogen.

e) Materialul impregnabil pare a fi reprezentat, în primul rînd, de hexoze susceptibile la digestia cu galactozidază (*fig. 64*) şi, în parte, de acidul sialic, a cărui degradare duce şi la dispariţia colorabilităţii cu albastru alcian.

f) Fracţiile hexozice purtătoare de grupări hidroxil vicinale convertibile în aldehide sînt legate de proteine necolagene, întregul complex putînd fi hidrolizat de proteaze nespecifice, dar rezistînd la digestia cu colagenază. De asemenea, în mod surprinzător, întregul complex este susceptibil la digestia cu elastază, fără a prezenta particularităţile histochimice ale fibrelor elastice (*fig. 65*).

g) Metodele utilizate nu ne-au permis să evidenţiem colagenul, deşi datele de biochimie menţionează cantităţi care depăşesc limitele convenţional stabilite pentru apariţia colorafiei cu picrofucsina Van-Gieson.

Datele de analiză structurală menţionate pot constitui punctul de plecare al unor consideraţii speculative asupra particularităţilor funcţionale ale membranelor bazale glomerulare. În primul rînd, existenţa unui număr important de legături intermoleculare ar putea influenţa gradul de porozitate a filtrului reprezentat de membrana bazală glomerulară, constituind astfel o verigă patogenică în apariţia tulburărilor de filtrare din hipertensiunea arterială în special, şi din nefropatii, în general. În al doilea rînd, susceptibilitatea la elastază a unui complex macromolecular fără afinităţile tinctoriale ale fibrelor elastice, dar cu un conţinut bogat în colagen neorientat în fibrile cu periodicitate caracteristică, sugerează o formă de organizare structurală adaptată condiţiilor hemodinamice particulare din glomerulii renali. Absenţa unei orientări cristaline în interiorul macromoleculelor evidenţiată difractometric, existenţa legăturilor intermoleculare, demonstrată prin metode histochimice şi bogăţia în hidroxilizină, menţionată în cercetări de chimie, sugerează un mod de organizare macromoleculară particular „elastomerilor", care necesită să fie analizat în continuare.

Alterările organizării macromoleculare a membranei bazale a glomerului renal sînt adesea asociale cu cele ale mezangiului. Sub această denumire se desemnează un tip special de ţesut conjunctiv, situat între ansele capilare ale glomerulului, incluzînd substanţă fundamentală, fibre de colagen extrem de fine şi celule dotate cu capacităţi macrofage. Deşi descrierea mezangiului datează de patru decenii [1222], discuţiile asupra existenţei şi semnificaţiei sale funcţionale continuă în literatura de specialitate. Nu vom insista asupra acestor date contradictorii, nici asupra diferitelor nomenclaturi propuse, limitîndu-ne să menţionăm că toate elementele identificate în mezangiu par să prezinte variaţii patologice destul de importante, frecvent asociate cu alterările în organizarea macromoleculară a membranei bazale glomerulare. Pe baza variaţiilor densităţii la electroni a spaţiilor intercelulare, se sugerează că substanţa fundamentală a mezangiului ar suferi depolimerizări şi hiperpolimerizări, că în această

Scanned with OKEN Scanner

zonă ar apare frecvent edem şi înmulţiri ale numărului de fibrile colagene şi de celule cu proprietăţi macrofage, sau cu aspect de element muscular neted. În sfîrşit, mai notăm că mezangiul ar fi sediul de acumulare a unor substanţe străine sau a unor complexe macromoleculare patologice, vehiculate de sîngele circulant, cum ar fi hialinul, amiloidul, metalele grele etc. Nu se cunosc relaţiile morfologice şi funcţionale dintre mezangiu şi membrana bazală a glomerulilor; din punct de vedere ultrastructural apar ca entităţi bine individualizate, ce prezintă raporturi de vecinătate [316]. Se acceptă ideea că mezangiul ar constitui un suport şi un mediu de glisare a capilarelor glomerulare, pe care le menţine într-o anumită stare de tensiune visco-elastică. De aceea, dispariţia stabilităţii structurale a mezangiului, ca o consecinţă a unor procese litice, ar fi urmată de împrăştierea dezordonată a anselor capilare în cavitatea glomerului renal.

În cursul apariţiei şi evoluţiei leziunilor renale ce determină sau/şi însoţesc hipertensiunea arterială, s-ar putea individualiza trei stadii ale alterărilor organizării macromoleculare a membranelor bazale glomerulare şi mezangiului. În primul stadiu, frecvent mut din punctul de vedere al manifestărilor clinice, biopsiile permit să se evidenţieze la microscopul electronic îngroşări focale ale membranei bazale (*fig. 66*), precum şi fuzionarea parţială a podocitelor. La microscopul fotonic un ochi experimentat depistează o intensificare a metacromaziei după sulfatare, reflectînd o înmulţire a grupărilor hidroxil purtate de hexoze. La coloraţiile de rutină, rinichiul are aspect normal şi, de aceea, de multe ori, biopsia este considerată neconcludentă şi hipertensiunea arterială fără substrat lezional. Nu se ştie încă în ce măsură se înmulţesc legăturile intermoleculare în complexele glicoprotidico-colagene ale membranelor glomerulare, diminuînd gradul de permeabilitate şi impunînd creşterea presiunii sistolice ca să se poată menţine acelaşi regim de filtrare. Teoretic, această convertire a normostabilităţii în hiperstabilitate structurală, ca factor iniţial în determinarea hipertensiunii arteriale, poate precede timp de mai mulţi ani apariţia leziunilor decelabile cu metodele de rutină care atestă „renalizarea" hipertensiunii. În stadiul al doilea, modificările pot fi atît preclinice, cît şi clinice. Ele sînt în general evidenţiabile, pe biopsii, cu ajutorul reacţiei PAS care apare mai intensă, mai uniformă şi sugerează îngroşarea anumitor bazale, pe zone limitate ale glomerulilor. În sfîrşit, stadiul al treilea, accesibil să fie diagnosticat şi cu metodele de rutină, este dominat de acumulări de complexe macromoleculare patologice, pe care le denumim convenţional fibrinoid, hialin, paraproteine etc., precum şi de un anumit grad de fibroză a mezangiului. În general, toate aceste modificări se însoţesc de o creştere a gradului de stabilitate structurală, respectiv de convertirea normostabilităţii în hiperstabilitate, reflectată de o importantă mărire a rezistenţei complexelor macromoleculare din glomeruli la extracţii enzimatice şi chimice, în comparaţie cu rinichiul de la normotensivii de aceiaşi vîrstă. Este greu de precizat în stadiul actual al posibilităţilor noastre de investigaţie, dacă hiperstabilitatea structurală rezultă ca o adaptare la creşterea presiunii sistolice, sau dacă determină această creştere. În primul caz, ar fi indicată menţinerea în

Scanned with OKEN Scanner

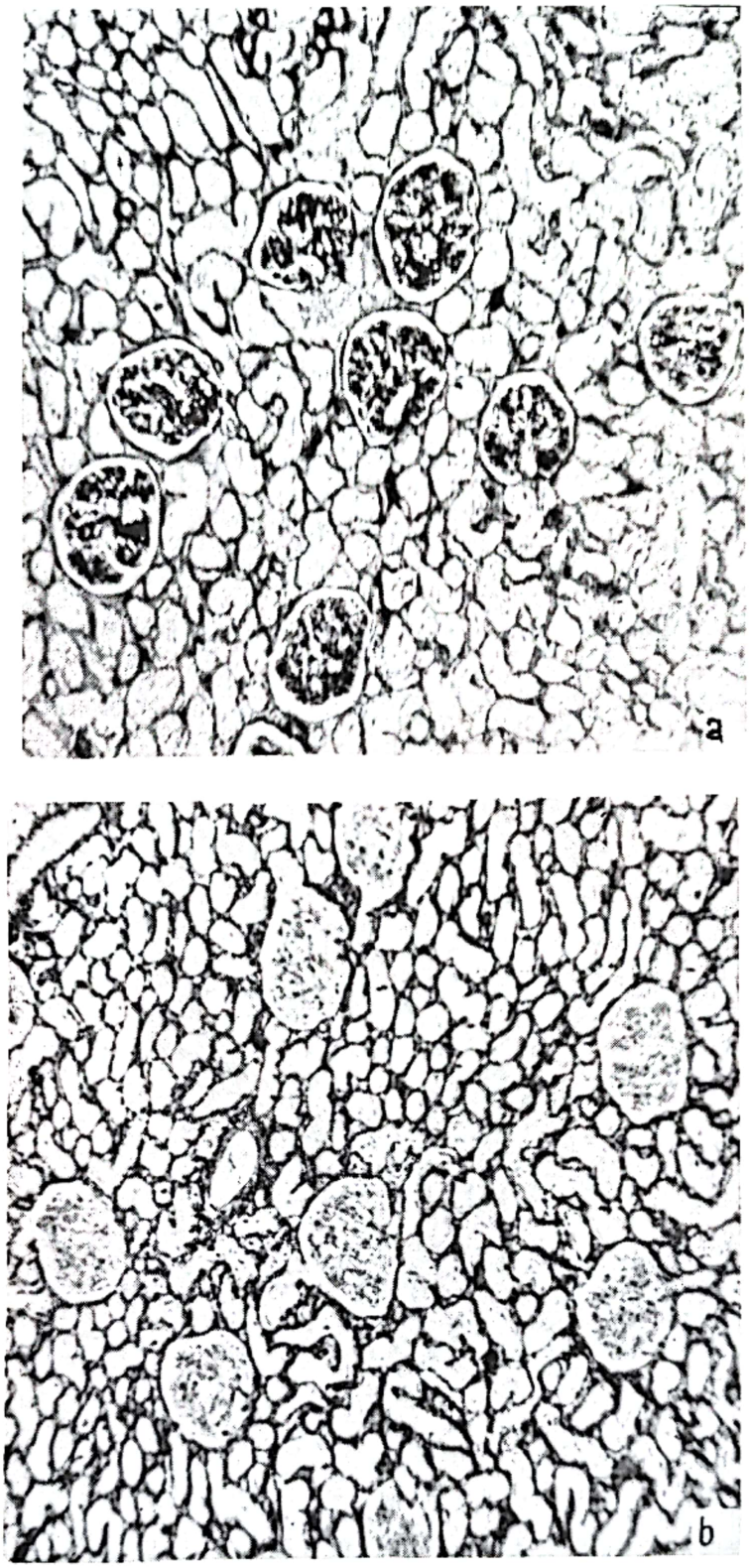


Fig. 63. Rinichi de adult. a) Impregnaţie intensă a membranelor bazale glomerulare, capsulare şi tubulare, cu metoda Jones, avînd ca agent oxidant acidul periodic. b) Absenţa impregnaţiei în membranele bazale glomerulare şi impregnaţie intensă în membrane bazale capsulare şi tubulare, cu metoda Gomori, avînle a agent oxidant hipermanganatul de potasiu (× 45).

Scanned with OKEN Scanner

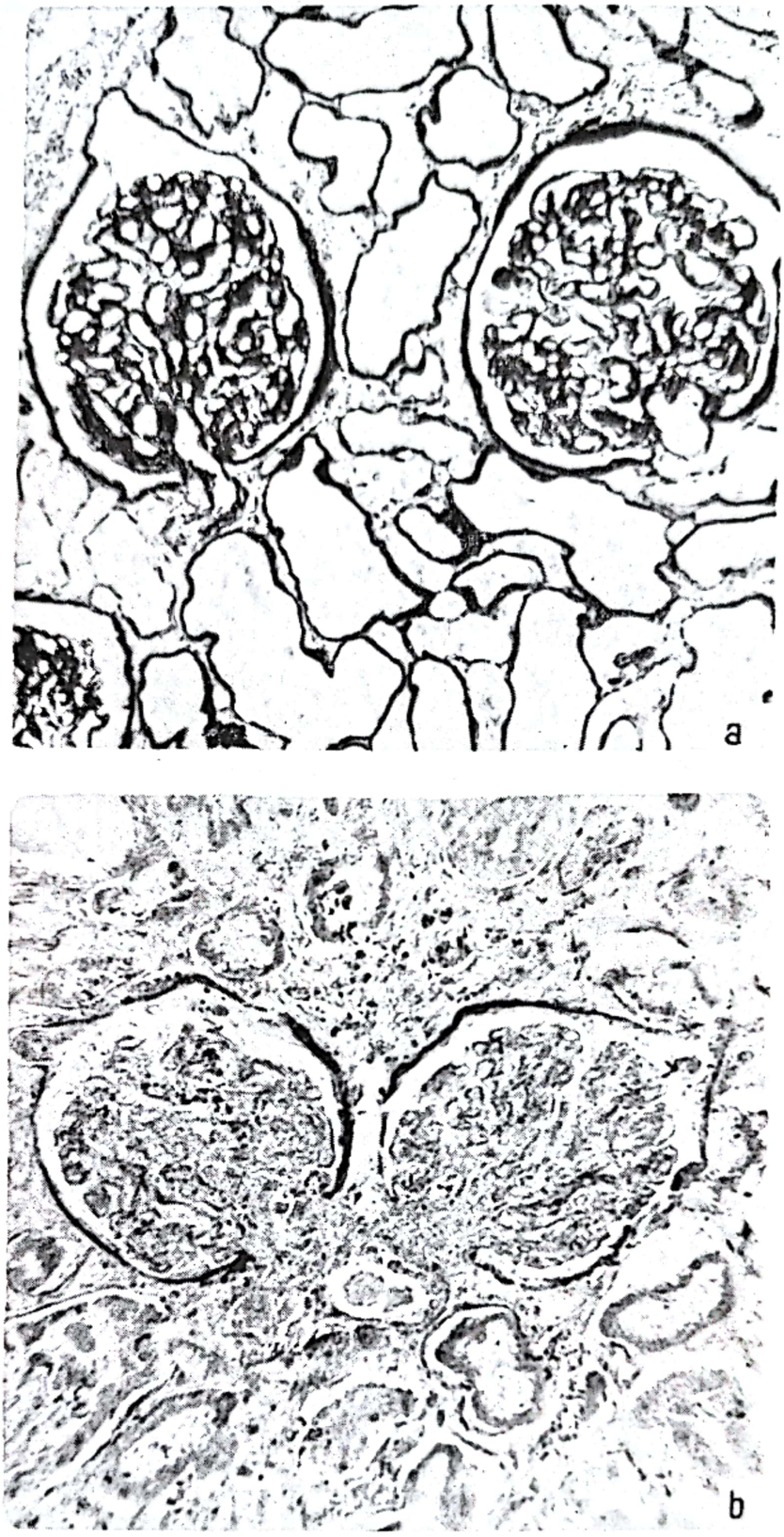


Fig. 64. Rinichi de adult. a) Impregnaţie după metoda Jones, membranele bazale glomerulare, capsulare şi tubulare apărînd intens argintofile. b) Digestie cu galactozidază, urmată de impregnaţie după metoda Jones. Dispariţia substratului impregnabil din membranele bazale glomerulare şi tubulare, o dată cu eliminarea galactozei; persistenţa argintofiliei în membrana bazală capsulară (× 880).

Scanned with OKEN Scanner

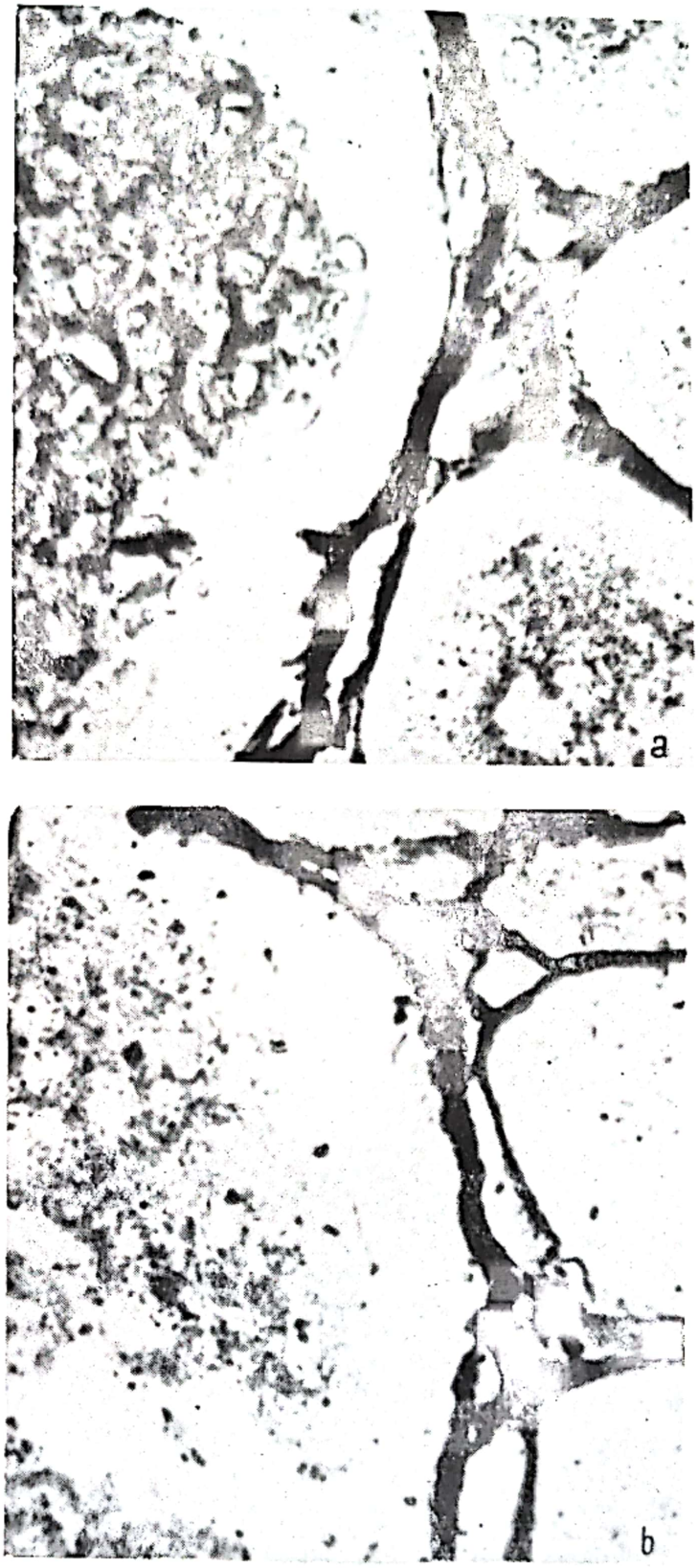


Fig. 65. Rinichi de adult. a) Impregnaţie după metoda Jones, membranele bazale glomerulare, capsulare şi tubulare apărînd intens argintofile. b) Digestie cu elastază, urmată de impregnaţie după metoda Jones. Dispariţia substratului impregnabil numai în membranele bazale glomerulare şi persistenţa lui în membrana bazală capsulară şi tubulară (× 3 200).

Scanned with OKEN Scanner

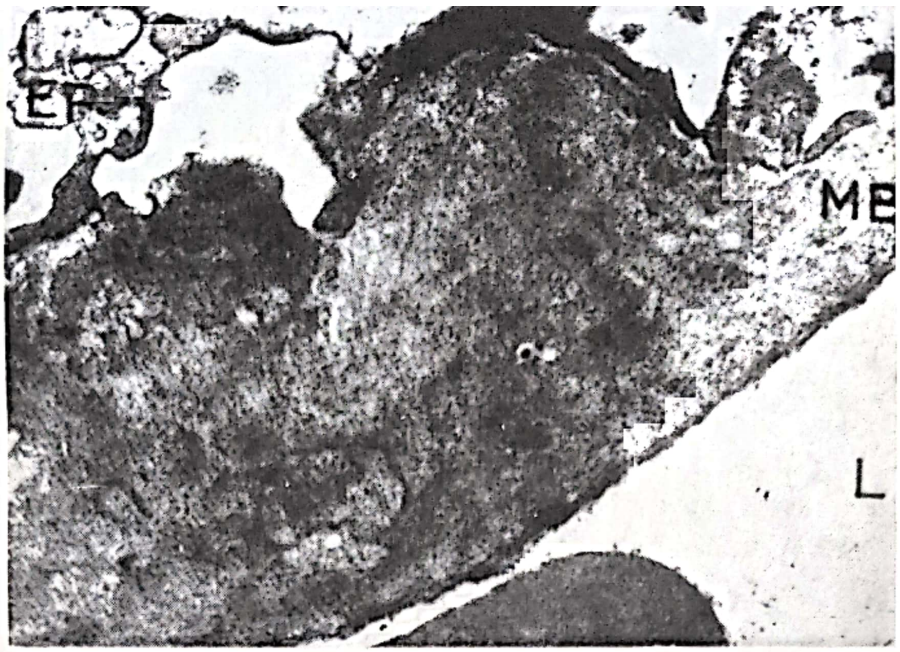


Fig. 66. Aspect electronomicroscopic al îngroşărilor focale ale membranei bazale glomerulare. La extremitatea dreaptă a figurii, membrana are grosimea normală (MB, membrană bazală; EP, citoplasma celulelor epiteliale; L, lumenul capilarului glomerular), (× 42 000) (GALLE [365], reprodus cu permisiunea editurii Flammarion).

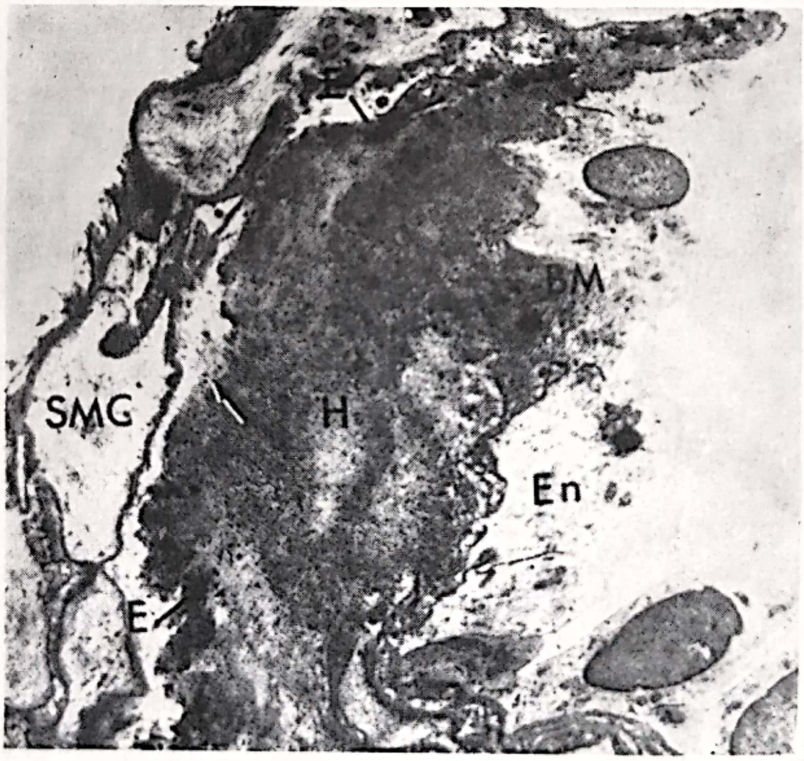


Fig. 67. Aspect electronomicroscopic al acumulărilor focale de hialin (H) în arteriolele renale. Stratul endotelial (En) este împins spre lumen, iar, în anumite zone indicate de săgeată, a dispărut şi ţesutul elastic. Între depozitul de hialin (H) şi celulele musculare netede (SMC) apare un spaţiu liber. Membrana bazală a endoteliului (BM) este, în parte, fuzionată cu materialul acumulat (× 5 600), (BIAVA, DYRDA, GENEST şi BENCOSME [128], reprodus cu permisiunea editurii Harper şi Row).

Scanned with OKEN Scanner

limitele reversibilității spre normostabilitate atîta timp cît presiunea din lumenul capilar rămîne anormal ridicată; în al doilea, ar fi indicată anihilarea ei imediat ce a putut fi depistată, fiind o cauză potențială a apariției hipertensiunii. Modul în care am putea interveni terapeutic în aceste două eventualități rămîne să fie precizat în viitor, pe măsură ce importanța alterărilor în stabilitatea structurală a macromoleculelor va atrage tot mai mult atenția cercetătorilor.

Rolul unor produși intermediari de metabolism care pot interconecta anormal macromoleculele, a fost menționat la p. 133. Nu se știe încă dacă în cazul hipertensiunii arteriale așa-zise esențiale, a existat un stadiu premergător apariției bolii în care aceste substanțe au putut acționa asupra membranelor glomerulare, convertind normostabilitatea lor în hiperstabilitate structurală. De aceea, ne vom limita să discutăm factorii cunoscuți și general acceptați, cum ar fi, de exemplu, hipoxia prelungită. În fiecare glomerul existînd o arteriolă aferentă proprie, gradul de ischemie locală va fi dependent de gradul alterărilor peretelui vasului respectiv. Cînd intima este foarte îngroșată, sau cînd apar acumulări de fibrinoid sau de hialin (*fig. 67*), însoțite de hiperplazii ale mediei, aportul sanguin către glomerul se reduce. În plus, substanțe rezultînd din metabolismul ce are loc în condiții de hipoxie prelungită, se acumulează în masa membranelor bazale glomerulare. Variabilitatea modificărilor în peretele fiecărei arteriole aferente poate explica variabilitatea gradului de alterare a fiecărui glomerul în parte, constituind un tablou caracteristic hipertensiunii arteriale. Leziunile evoluează pînă la procese cicatriciale, reflectate de reducerea volumului rinichilor, a greutății lor care ajunge la 120—200 g și de apariția granulațiilor și retracțiilor pe suprafața organului. Asocierea glomerulilor ajunși în stadiul de hialinizare cu glomeruli aparent normali, precum și posibilitatea de a corela procesele de fibroză cu cele ischemice, ușurează diagnosticul diferențial cu glomerulonefrita cronică, iar absența interesării caliciului, cu pielonefrita. S-a susținut că ar exista o corelație între durata ischemiei și frecvența apariției de glomeruli fibrozați, ajunși în stadiul de mase eozinofile acelulare. De reținut, de asemenea, că apar și leziuni la nivelul capsulei Bowmann, mai ales sub aspectul acumulării de material glicoproteic pe fața ei glomerulară. Acest material devine ulterior fucsinofil, fără să fie susceptibil la colagenază și fără să prezinte la lumină polarizată particularitățile de birefringență ale colagenului. De aceea pare mai curînd a fi alcătuit dintr-o fibrină modificată, cu particularități tinctoriale anormale. Spre deosebire de alte tipuri de glomerulopatii, în hipertensiunea arterială nu se întîlnesc, în general, și fibroze pericapsulare. Cînd boala ia caracter malign, predomină acumulările de fibrinoid și de hialin, atît în vasele arteriolare cît și în glomerulii anexați lor. Nu se cunoaște încă compoziția chimică a complexelor macromoleculare patologice, fiind susținută atît origina lor plasmatică, mai ales proteică și lipoproteică, cît și geneza lor locală, ca produși de sinteză ai celulelor din pereții vasculari și din jurul membranelor bazale glomerulare. Este interesant de reținut constatarea că, la om, leziunile renale în hipertensiunea arterială ajung în stadiul de necroză, fibrinoid și hialin, fără a

Scanned with OKEN Scanner

se însoţi de infiltraţii celulare, pe cînd în hipertensiunea experimentală aceste infiltraţii sînt foarte frecvente.

Ar fi unilateral de considerat că mecanismul patogenic atît de complex al hipertensiunii arteriale poate fi redus la o simplă interacţiune între presiunea intracapilară şi gradul de stabilitate structurală a membranei bazale glomerulare. Prezentarea făcută de noi nu a urmărit această unilateralizare şi simplificare a problemei, ci a dorit să atragă atenţia asupra existenţei unor modificări în organizarea macromoleculară a acestor membrane, care pot coexista cu aspectul „normal" al rinichilor la tehnicile de rutină. Ele nu trebuiesc trecute cu vederea mai ales în studiile asupra hipertensiunii esenţiale, denumire care exprimă, probabil, limitele noastre actuale în înţelegerea şi evidenţierea modificărilor care apar la nivel macromolecular.

HEPATITE CRONICE ŞI CIROZE

Importanţa studiului alterărilor organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv în hepatite cronice şi ciroze este subliniată de constatarea că, în numeroase ţări, ele reprezintă cauza de mortalitate a peste 20 la 100 000 din populaţia ce a depăşit vîrsta de 40 de ani [867].

Aportul nostru la acest studiu urmăreşte să ajute clinicianul să intervină profilactic în cel mai neglijat stadiu din evoluţia bolilor cronice : perioada ce precede dezvoltarea leziunilor ireversibile de fibroză difuză. În patologia ficatului, această perioadă de lungă durată se situează între episodul acut al hepatitei epidemice şi ciroza consecutivă acestei infecţii, între primele alterări determinate de alcoolism şi ciroza consecutivă acestei intoxicaţii, între leziunile discrete produse de colostază şi ciroza biliară, între reacţiile antigen-anticorp neadecvate şi apariţia amiloidozei hepatice. Această orientare „preclinică" [1098] a anatomiei patologice, bazată pe cuceririle cele mai noi ale morfologiei, are o importanţă mai mare în hepatologie decît în alte domenii ale medicinii interne, datorită utilizării tot mai largi a puncţiei-biopsie. Experienţa ultimelor două decenii a demonstrat tuturor specialiştilor că nici examenul clinic, nici alte variate investigaţii de laborator, nu pot da informaţii asupra alterărilor incipiente în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv hepatic şi care constituie preludiul evoluţiei spre ciroză. Singurul mijloc de a obţine aceste informaţii îl reprezintă biopsia, studiată nu numai cu tehnicile de rutină, ci şi cu anumite metode de histochimie, histoenzimologie şi microscopie electronică. Într-adevăr, pe un fragment de ficat aparent „normal" la coloraţiile cu hemalaun-eozină, picrofucsină Van-Gieson sau impregnaţie pentru reticulină după metoda Gomori se pot evidenţia : *a*) scăderi ale activităţii adenozintrifosfatazice şi lezarea inframicroscopică a microvililor de la polul biliar al hepatocitului, exteriorizînd alterarea funcţiei de secreţie şi excreţie a bilei ; *b*) scăderi ale activităţii 5-nucleotidazice, fosfatazice alcaline şi esterazice şi lezarea inframicroscopică a microvililor de la polul sanguin

Scanned with OKEN Scanner

al hepatocitului, exteriorizînd alterarea funcţiei de absorbţie a materialului înmagazinat în spaţiul Disse; *c*) scăderi ale activităţii fosfatazice acide şi lezarea inframicroscopică a lizozomilor, exteriorizînd reducerea capacităţii de fagocitoză, coloidopexie şi pinocitoză; *d*) scăderi ale numărului de canalicule ale reticulului endoplasmic şi de ribozomi, exteriorizînd, electronomicroscopic, diminuarea capacităţii de sinteză proteică; *e*) creşterea numărului de grupări hidroxil la nivelul spaţiului Disse, exteriorizînd, histochimic, o modificare în complexele macromoleculare ale membranelor bazale sinusoidale. Exemplele de mai sus, care ar putea fi multiplicate, demonstrează cît de limitate sînt tehnicile convenţionale în depistarea alterărilor morfologice ce preced apariţia leziunilor şi cît de relativ este calificativul de „normal", cînd nu folosim decît metodele de rutină. Aceasta explică şi de ce există încă o neconcordanţă destul de mare între gravitatea anumitor semne clinice şi probe de laborator, pe de o parte, şi aspectele de minimă alterare lezională, pe de altă parte.

În cursul prezentei expuneri ne vom feri să facem o delimitare strictă între anumite forme grave ale hepatitei cronice şi ciroza spre care evoluează, aceste delimitări avînd doar un caracter convenţional, reflectat şi de terminologia utilizată (hepatite cirogene, forme precirotice ale hepatitelor etc.). În schimb, vom insista asupra gradului de stabilitate structurală a ţesutului conjunctiv de neoformaţie, dinamica variabilităţii acestui grad (spre hipostabilitate sau spre hiperstabilitate) putînd fi corelată, pînă la un anumit punct, cu caracterul reversibil sau ireversibil al fibrozei.

Alterările organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv hepatic pot fi întîlnite în forma cronică a hepatitei, atît în cursul unui proces prelungit de vindecare, cît şi în cursul unei evoluţii particulare, care duce la întreţinerea şi agravarea bolii. Cînd forma cronică a hepatitei epidemice apare ca un stadiu intermediar, prelungit, de vindecare a fazei acute, leziunile trec succesiv, în decurs de 6 — 12 luni, spre *restitutio ad integrum*. În acest interval de timp alterările parenchimatoase şi interstiţiale regresează, faza histopatologică de evidenţiere a leziunilor fiind treptat înlocuită cu cea histochimico-ultrastructurală, după care ficatul îşi reia aspectul normal. Cînd hepatita epidemică nu se ameliorează după 6 — 12 luni, forma cronică apare ca un stadiu de evoluţie particulară ce succede fazei acute. În cadrul acestei forme se pot individualiza: *a*) leziuni parenchimatoase şi interstiţiale care ani la rînd pot fi decelate cu metodele histopatologice de rutină; explorările funcţionale demonstrează de cele mai multe ori o insuficienţă hepatică ce poate fi corelată cu aspectul microscopic al biopsiei; *b*) leziuni parenchimatoase şi interstiţiale care, după ce au rămas luni sau ani în stadiul modificărilor histopatologice, trec, de asemenea pentru un timp îndelungat, în faza alterărilor histochimico-ultrastructurale; aceste alterări nu pot fi evidenţiate decît prin metode speciale, în timp ce colorаţiile de rutină aplicate la biopsii arată un aspect aparent normal, sau de leziuni „stabilizate"; explorările funcţionale indică, de multe ori un anumit grad de insuficienţă hepatică al cărei substrat morfologic nu poate fi susţinut prin tehnicile histopatologice de rutină; *c*) leziuni parenchimatoase care rămîn în faza alterărilor histochimico-ultrastructurale, iar cele

Scanned with OKEN Scanner

interstiţiale trec, sub un nou aspect, în stadiul mai sever al modificărilor decelabile histopatologic. Sînt formele cu tendinţă evolutivă spre ciroză, la care explorările funcţionale dau uneori rezultate incerte şi numai examenul biopsic evidenţiază dezvoltarea treptată a neoformaţiei de fibre conjunctive. Asupra acestor ultime forme de leziuni ne vom centra atenţia în rîndurile care urmează.

Particularităţi biochimice şi morfologice ale procesului de fibroză hepatică

Dinamica procesului de fibrogeneză intrahepatică, ca rezultat al alterării organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv din spaţiile porte şi interstiţiile intralobulare, a fost analizată atît prin studii biochimice, cît şi prin observaţii morfologice, investigîndu-se deopotrivă material uman şi experimental. Utilizarea hepatotoxicelor (etionină, tetraclorură de carbon), ca şi a carageninei şi bioxidului de siliciu, a permis realizarea unor modele experimentale care reproduc, într-o anumită măsură, atît leziunile de fibroză difuză, cît şi pe cele de fibroză focală. Deşi aceste modele sînt lipsite de valoarea pe care le-ar conferi-o o etiologie similară celei din patologia umană, ele pot constitui totuşi auxiliare utile ca termen de referinţă pentru aprofundarea verigilor patogenice ale dezvoltării leziunilor de fibroză hepatică la om. Studiile efectuate în aceste domenii au avut ca orientare principală : *a*) particularităţile topografice ale procesului de fibroză hepatică ; *b*) caracteristicile chimice şi morfologice ale colagenului neoformat ; *c*) corelarea dezvoltării fibrozei cu acumulările de mucopolizaharide ; *d*) participarea celulară la procesul de fibrogeneză.

Fibroza apare în ficat cu următoarele localizări principale : portală, care ar rezulta din neoformarea de fibre colagene după tipul întîlnit în alte teritorii conjunctive ale organismului ; periductulară, ca urmare a acumulării de celule şi fibre conjunctive în jurul epiteliilor canaliculelor de neoformaţie ; perihepatocelulară, apărînd fie prin colapsul stromei şi fuzionarea reţelelor reticulinice, consecutiv necrozei hepatocitelor, fie prin neoformarea şi acumularea locală de colagen.

Fibroza portală nu a fost analizată pînă acum din punctul de vedere al particularităţilor organizării macromoleculare. Se consideră că este vorba de un tip obişnuit de ţesut conjunctiv, cu fibre colagene groase, ce se interpun între vase şi căi biliare. Între fibre ar exista un material cu particularităţile histochimice atît ale glicoproteinelor, cît şi ale mucopolizaharidelor acide. La microscopul electronic fibrilele au un diametru de aproximativ 200 Å, cu variaţii destul de reduse şi cu o periodicitate de aproximativ 600 Å. Sînt grupate în fibre cu diametrul de 1 — 2 μ, conţinînd, fiecare, aproximativ 1 500 de fibrile [870]. Diversele aspecte morfologice, întîlnite în patologia umană, ale fibrozei portale sînt prezentate sub o terminologie pur descriptivă (fibroză stelată, difuză, concentrată, neregulată) sau convenţional catalogată, ca stabilizată sau evolutivă. Fibroza spaţiilor porte nu ar exterioriza decît o creştere a numărului şi diametrului fibrilelor

Scanned with OKEN Scanner

şi fibrelor colagene, păstrîndu-se însă aceleaşi caracteristici ultrastructurale proprii colagenului normal.

În cercetări în curs de efectuare, anumite rezultate preliminare ne permit să susţinem că există o corelaţie semnificativă între modul de organizare macromoleculară a fibrelor şi tipul dominant al celulelor de infiltraţie. În acest sens, fibroza apare cu atît mai lent şi fibrele au o stabilitate structurală cu atît mai redusă, cu cît limfocitele sau elementele de tip limforeticular sînt mai abundente. În lumina acestor date, infiltraţiile cu aşazise celule rotunde, par a reprezenta, în anumite condiţii, o reacţie adecvată de inhibare a neoformaţiei fibrilare, acţionînd ca un factor antisclerogen.

Fibroza periductulară a fost semnalată mai ales pe material experimental, după administrarea de hepatotoxice. S-a sugerat că celulele ductulare neoformate ar excreta un material cu efecte „iritative", care stimulează proliferarea fibroblastică şi acumularea colagenului [827]. Prezenţa unor celule cu aspect fuziform în vecinătatea segmentelor iniţiale ale căilor biliare, nu implică, totuşi, şi activităţi fibroblastice ale acestor celule. De asemenea, este dificil să se realizeze diferenţierea netă între celulele ductulare şi unele celule Kupffer alungite, situate în teritoriile respective. Mai mult, pe materialul uman analizat, proliferarea ductulară cu caracterul descris la animalele mici de laborator apare extrem de rar. De aceea, cu toată insistenţa cu care numeroşi autori apără ipoteza rolului „reacţiei celulelor ductulare" în dezvoltarea fibrozelor hepatice, credem că implicaţiile acestui mecanism sînt importante în modelele experimentale folosite, dar încă nedemonstrate convingător în patologia umană.

Fibroza perihepatocelulară se poate dezvolta ca urmare a două procese distincte. Primul proces rezultă din colapsul stromei, consecutiv dispariţiei hepatocitelor, cu fuzionarea şi reduplicarea reţelelor reticulinice preexistente [869]. Aspectul de condensare neregulată a fibrelor reticulinice care constituie un înveliş gros în jurul celulelor alterate, este evidenţiat electronomicroscopic prin imagini de agregare a fibrilelor în fascicule groase, cu diametrul pînă la 2μ. Mecanismul intim al constituirii acestui tip de fibroză este încă puţin studiat. Nu se poate însă elimina total ipoteza că în aceste zone de alterări şi necroze celulare ar interveni şi procese de neoformare fibrilară. În sprijinul acestei ipoteze ar pleda şi observaţia că produşii de degradare a hepatocitelor pot acţiona ca stimuli pentru proliferarea celulelor mezenchimale locale, cu elaborare ulterioară de substanţe necesare procesului de fibrilogeneză.

Al doilea mecanism de apariţie a fibrozei perihepatocelulare este tocmai acest mecanism de fibrilogeneză locală [726, 870, 1032]. El poate duce la izolarea metabolică a hepatocitelor, cu interferarea directă a funcţiilor lor, rezultînd o alterare progresivă a parenchimului. De aceea a constituit subiectul unei analize amănunţite în cadrul investigaţiilor noastre. Cercetările de histochimie efectuate pe biopsii hepatice de la cazuri cu hepatită cronică în variate stadii de evoluţie clinică (care nu prezentau colaps postnecrotic al reţelelor reticulinice, reduplicarea acestor reţele, ca şi acumulări

Scanned with OKEN Scanner

de fibroblaşti, celule Kupffer şi elemente de infiltraţie) ne-au permis să evidenţiăm :

— în zonele aparent normale ale lobulilor, fibrele reţelei reticulinice, secţionate transversal, apar sub aspectul unor puncte sau virgule, cu diametrul de aproximativ 1μ, separate de spaţii ce variază între 1 şi 3μ ;

— în zonele cu alterări în organizarea macromoleculară a reţelelor apare o îngroşare progresivă a fibrelor argintofile. Acest proces coexistă, sau este precedat, de o intensificare a reacţiei PAS şi a metacromaziei după sulfatare. Nu am putut evidenţia o creştere a reactivităţii unor grupări acide, aparţinînd mucopolizaharidelor sau glicoproteinelor bogate în acid sialic. În cursul acestei îngroşări, din ce în ce mai evidentă, apare un aspect special în impregnaţia agrentică, caracterizat prin formarea, în fiecare fibră îngroşată a unui material central neimpregnabil, înconjurat de o teacă intens argintofilă (*fig. 55*). Acest nucleu central dispare după incubaţii cu colagenază, sau după tratamente cu soluţii care rup legături electrostatice sau punţi de hidrogen, sugerînd că este vorba de un colagen sărac în legături intermoleculare [1126]. Cînd diametrul fibrelor îngroşate se apropie de 3μ, devine evidentă capacitatea lor de a lega picrofucsina Van-Gieson, reţeaua de reticulină apărînd colorată în roşu. Materialul fucsinofilic rămîne în continuare susceptibil la digestia cu colagenază. Acetilarea blochează impregnaţia argentică, dar nu influenţează fucsinofilia, în timp ce sulfatarea le blochează pe amîndouă. Într-o fază ulterioară de evoluţie, începe diminuarea argintofiliei, fibrele îngroşate devin maronii sau galben-maronii, mărindu-se în acelaşi timp fucsinofilia, în timp ce, treptat, scade susceptibilitatea la colagenază.

Date de microscopie electronică au demonstrat că fibrele reticulinice din spaţiul Disse sînt alcătuite din pachete izolate de fibrile colagene, unele mai tinere, alte mai mature, sugerînd o continuă neoformare [1165]. Investigaţii biochimice au evidenţiat o creştere a cantităţii de hidroxiprolină din ficat, paralelă cu neoformarea de fibre reticulinice [566]. În lumina acestor rezultate şi a analizelor noastre histochimice, fibroza perihepatocelulară din zonele unde nu există procese de necroză, ar rezulta dintr-o multiplicare nefiziologică a fibrelor de colagen incluse în matricea glicoprotidică a reţelei reticulinice. În comparaţie cu fibrele de colagen din spaţiile porte ale aceloraşi biopsii, fibrele fucsinofile din jurul hepatocitelor prezintă un grad mai redus de stabilitate structurală, aşa cum apare din rezultatele sintetizate în tabelul IX [1107, 1126, 1131].

Importanţa acestor rezultate va fi subliniată în paginile următoare, corelată cu discuţia procesului de reversibilitate a leziunilor de fibroză hepatică.

Menţionăm şi investigaţiile noastre privind frecvenţa apariţiei fibrozei perihepatocelulare, corelată cu tipul hepatopatiei [1140]. Din aceste investigaţii a rezultat că : *a*) acumularea perihepatocelulară a colagenului apare ca proces patologic general, nefiind particulară unei anumite perioade de vîrstă sau unui anumit tip de hepatopatie cronică ; *b*) gradul de stabilitate structurală a colagenului perihepatocelular pare influenţat, în primul rînd, de starea funcţională a celulei hepatice, hiperstabilitatea

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul IX

Acţiunea digestiilor enzimatice şi a extracţiilor chimice asupra stabilităţii structurale a materialului fucsinofilic din spaţiile porte şi perisinusoidale (VELICAN, C. [1107]; VELICAN, C. şi VELICAN, D. [1126]).

Tehnici anterioare impregnaţiei argentice	Fucsinofilia	
	PORTALA	PERIHEPATOCELULARA
Colagenază, 3 ore	nemodificată	dispărută
Acid tanic + colagenază	nemodificată	nemodificată
Formol + colagenază	nemodificată	nemodificată
Sialidază + colagenază	nemodificată	dispărută
Lizozim + colagenază	nemodificată	dispărută
Hialuronidază + colagenază	nemodificată	dispărută
Papaină, 30 de minute	nemodificată	diminuată
Pepsină, 30 de minute	nemodificată	diminuată
Tripsină, 30 de minute	nemodificată	nemodificată
NaCl 0,85%, 24 de ore la 37°C	nemodificată	nemodificată
NaCl 10%, 24 de ore la 37°C	nemodificată	dispărută
KOH 1%, 24 de ore la 25°C	nemodificată	diminuată
Tampon citrat pH 3, 5, 24 de ore	diminuată	dispărută
Apă distilată, 15 minute la 90°C	nemodificată	dispărută
Uree 8 M, 24 de ore la 37°C	nemodificată	dispărută
Acid tanic + uree	nemodificată	nemodificată
Formol + uree	nemodificată	nemodificată

însoţind leziunile degenerative şi necrotice, iar hipostabilitatea, procesele regenerative. În *fig. 68* ilustrăm frecvenţa cu care apar acumulările perihepatocelulare de colagen, cu particularităţile histochimice menţionate.

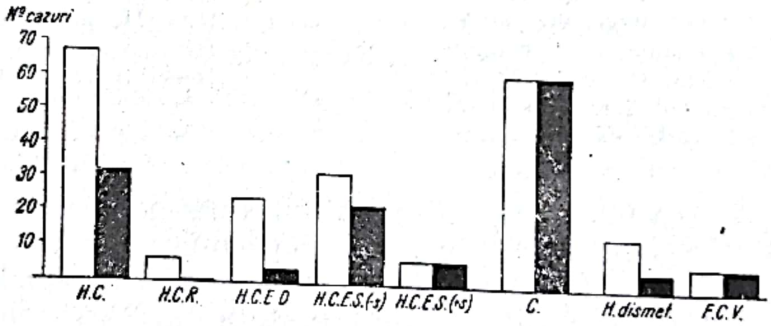


Fig. 68. Incidenţa acumulărilor perihepatocelulare de colagen, în diverse hepatopatii (■), raportată la numărul cazurilor studiate (□).
Legendă: HC, hepatită cronică; HCR, hepatită cronică reziduală; HCED, hepatită cronică evolutivă discretă; HCES (−S), hepatită cronică evolutivă severă fără splenomegalie; HCES (+ S), hepatită cronică evolutivă severă cu splenomegalie; C, ciroză; H dismet, hepatopatii dismetabolice; F.C.V., ficat vascular congestiv.

Pe materialul biopsic investigat, prezenţa acestui tip de fibroză am constatat-o la 100 % din cazurile de ciroză, indiferent de factorul etiologic; la 100 % din cazurile de hepatită cronică severă, cu splenomegalie; la

Scanned with OKEN Scanner

peste 2/3 din cazurile de hepatită cronică cu evoluţie clinică severă, dar fără splenomegalie în momentul efectuării biopsiei hepatice; la aproximativ 1/3 din cazurile de steatoză sau de hemocromatoză. Pe materialul necropsic am evidenţiat acest tip de fibroză la toate cazurile decedate prin insuficienţă de cord drept, consecutiv unui scleroemfizem pulmonar. Date privind analiza comparativă a gradului de stabilitate structurală a acumulărilor perihepatocelulare de colagen în diversele hepatopatii studiate,

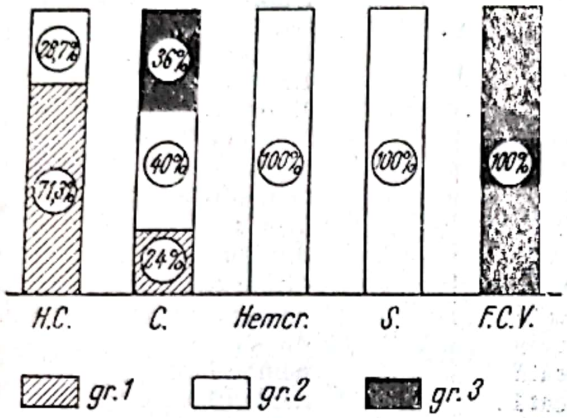


Fig. 69. Analiza stabilităţii structurale a colagenului perihepatocelular, în diverse hepatopatii.
Legendă: HC, hepatită cronică; C, ciroză; Hemocr, hemocromatoză; S, steatoză; Fcv, ficat vascular congestiv. Coloane haşurate: colagen degradat după 6 ore de digestie cu colagenază; coloane goale: colagen degradat după 12—24 de ore de digestie cu colagenază; coloane pline: colagen nedegradat de colagenază.

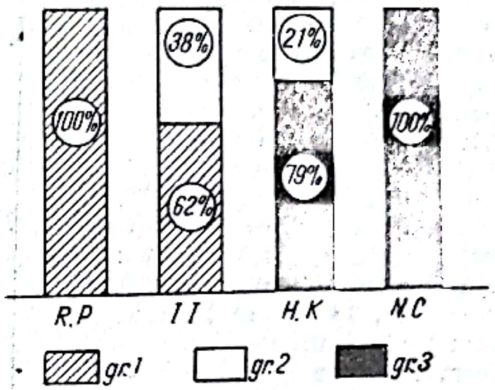


Fig. 70. Analiza stabilităţii structurale a colagenului perihepatocelular, corelată cu leziunea histologică dominantă. Legendă: NC, necroze celulare; HK, hiperplazia celulelor Kupffer; II, infiltrat inflamator; RP, regenerare parenchimatoasă (coloane, idem fig. 69).

sînt sintetizate în *fig. 69*. În *fig. 70*, prezentăm datele analizei comparative efectuate prin selecţionarea a 100 de cîmpuri microscopice pentru fiecare modificare morfologică, urmărind aceleaşi leziuni în diversele hepatopatii studiate. Din aceste observaţii rezultă o stabilitate structurală crescută în vecinătatea tuturor zonelor unde există leziuni degenerative severe sau procese necrotice ale hepatocitelor, precum şi în vecinătatea teritoriilor cu hiperplazia celulelor Kupffer. Dimpotrivă, fibrele au prezentat o hipostabilitate structurală în zonele cu regenerări de parenchim şi cu infiltrate inflamatoare intralobulare.

Mecanismul general de neoformare a colagenului în ficat, indiferent dacă este vorba de fibroză portală, periductulată sau perihepatocelulară, este încă mult discutat. Ficatul normal conţine 0,4 % hidroxiprolină, ceea ce corespunde cu 2,80 $\pm$ 0,91 g de colagen pentru 100 g de ţesut uscat şi delipidizat; 10 % din hidroxiprolină ar aparţine frecţiei solubile a colagenului [514]. Activitatea specifică a colagenului marcat prin prolină C_{14} creşte în hepatită, ca şi în ciroze, în comparaţie cu ficatul normal, depăşind aceste

valori de 3 — 5 ori. Creşterea interesează atît fracţia alcali-solubilă, cît şi cea insolubilă, cu predominanţa fracţiei solubile în perioadele iniţiale de dezvoltare a leziunilor [86]. Observaţia că raportul colagen solubil/colagen insolubil este similar în ficatul de copil şi în cel de adult sau bătrîn cu ciroză, deşi acesta din urmă conţine mult mai multe fibre de colagen, argumentează ipoteza că, independent de condiţiile de formare, fracţia solubilă ar reprezenta precursorul celei insolubile [513]. Reducerea acestei prime fracţii ar reflecta diminuarea sintezei colagenului şi evoluţia spre maturare a celui deja format. În cirozele experimentale, de exemplu, cantitatea de colagen se măreşte paralel cu acţiunea hepatotoxicului, pînă la atingerea unei concentraţii limită. Ulterior, chiar dacă acţiunea toxicului continuă, valorile maxime ale colagenului nu se mai modifică [925, 1185]. Dimpotrivă, apare o diminuare a sintezei, reflectată de exemplu, de reducerea încorporării în ficat a glicinei-C_{14} în fazele tardive de dezvoltare a cirozei prin tetraclorură de carbon [483]. Concomitent cu diminuarea sintezei, colagenul solubil este convertit în forma insolubilă prin agregare fibrilară, rezultînd neoformaţia de fibre, evidenţiabilă pe secţiunile microscopice. Astfel se acumulează fibre fucsinofile în spaţiile porte, periductular şi, mai ales, spre polul vascular al hepatocitelor, creind condiţiile mecanice ale apariţiei unei importante bariere între capilar şi parenchim. Distribuţia fibrelor colagene, mai abundente în zona periferică a acinilor [895], ar sugera influenţa hipoxiei în fibrilogeneză, la acest nivel existînd cea mai scăzută tensiune a oxigenului.

Anumite cercetări atrag atenţia asupra rolului mucopolizaharidelor acide în morfogeneza fibrozelor hepatice. Astfel, în intoxicaţia cronică cu etionină, conţinutul total în hexozamine depăşeşte cu peste 60 % valorile normale [1006]. Determinări fracţionate au sugerat că fibrogeneza hepatică este asociată în deosebi cu mărirea raportului galactozamină/glucozamină [1207]. Plecîndu-se de la aceste constatări, s-a susţinut că mucopolizaharidele ar constitui matricea adecvată pentru formarea fibrelor de colagen, după paternul cunoscut din analiza ţesutului de granulaţie. În acelaşi sens ar pleda şi anumite rezultate histoautoradiografice, care menţionează reţinerea radiosulfatului în septurile din ciroza experimentală, ca şi o importantă creştere a captării, de către celulele Kupffer, a sulfului marcat, considerată ca test al unei elaborări intense de mucopolizaharide în faza ce precede fibrilogeneza [836]. Existenţa unei alterări severe a parenchimului ar accentua acest proces. Datele menţionate se referă în special la observaţii experimentale. Pe materialul investigat de noi nu am putut face aprecieri asupra variaţiilor cantitative ale mucopolizaharidelor acide, menţionînd doar o acumulare de glicoproteine [1135]; este posibil ca anumite condiţii de fixare să fi influenţat rezultatele, urmînd să efectuăm noi investigaţii, pe preparate nefixate.

O ultimă problemă pe care dorim să o discutăm, în legătură cu procesul de fibrilogeneză colagenă din ficat, este participarea celulelor la elaborarea macromoleculelor. Participarea a fost sugerată de prezenţa anumitor elemente mezenchimale în vecinătatea imediată a fibrelor de neoformaţie. Ulterior, observaţii ultrastructurale şi histochimice au adus argumentaţia necesară susţinerii acestei participări, implicîndu-se în pro-

Scanned with OKEN Scanner

cesele secretorii : *a*) celulele Kupffer situate în vecinătatea leziunilor şi care prezentau un nucleu alungit şi o protoplasmă PAS-reactivă ; *b*) histiocitele şi fibroblaştii din spaţiile porte ; *c*) celulele periadventiciale ale arteriolelor [828]. Este greu de stabilit dacă toate celulele cu aspect fuziform au şi activitate fibroblastică, dar se poate presupune că această activitate există cînd elementul respectiv prezintă un reticul endoplasmic abundent, cu canalicule dilatate, conţinînd uneori un material omogen. Lîngă membrana celulară se văd agregate de filamente intracitoplasmatice fără periodicitate, cu diametrul sub 70 Å, iar la periferia celulei filamentele se acumulează în fibrile cu periodicitatea caracteristică a colagenului [1032]. În sprijinul ipotezei capacităţii celulelor Kupffer de a sintetiza colagen pledează şi constatarea că, în hepatopatiile cronice experimentale, ele încorporează masiv prolina marcată [837]. În fibrilogeneza intrahepatică ar mai juca rolul de element care sintetizează colagen, un tip de „celulă adventicială", cu aspect asemănător celulelor Kupffer [968], situată tot între endotelii şi hepatocite, reprezentînd un component normal al ficatului. Activitatea secretorie a materialului care va constitui fibrilele din spaţiul Disse este reflectată prin apariţia unor cisterne largi ale reticulului endoplasmic, ca şi prin prezenţa, lîngă suprafaţa celulelor, a unor filamente cu diametrul de 250 Å. Acestea devin progresiv mai groase, pe măsură ce se depărtează de elementul care le-a format, ajungînd la un diametru de aproximativ 500 Å în vecinătatea imediată a hepatocitelor [929]. Celulele ductulare au fost, de asemenea, incriminate în procesul de fibrilogeneză. În ficatul normal peste 60% din populaţia celulară este reprezentată de hepatocite, iar elementele ductulare sînt rare. În leziunile produse prin etionină, se constată o creştere progresivă a celulelor ductulare, ajungînd să constituie, după 5 săptămîni, aproximativ 50% din populaţia celulară a ficatului. După 7 săptămîni, numărul lor continuă să se mărească, la 2/3, în timp ce hepatocitele scad la 1/10 [924]. Celulele ductulare proliferate apar fie ca structuri tubuliforme în jurul unui lumen, fie ca aglomerări neorganizate în care se schiţează lumenele. În leziunile constituite se observă o membrană bazală periductulară, la exteriorul căreia sînt acumulate fibrele neoformate. S-a sugerat că celulele ductulare nu ar participa direct la elaborarea colagenului, ci indirect, prin aşa numita „reacţie a celulelor ductulare" [868]. Aceasta presupune un rol dublu : 1) de stimulare a formării fibrelor, probabil prin elaborarea unui material iritant [827] ; 2) de constituire de machete, necesare orientării fibrelor de neoformaţie [870].

Problema reversibilităţii leziunilor de fibroză hepatică

Posibilitatea reversibilităţii leziunilor de fibroză hepatică prezintă un interes deosebit pentru clinică, prin implicaţiile sale prognostice şi terapeutice. Observaţii comparative, pe biopsii repetate la acelaşi anima, în cursul hepatitelor experimentale, au evidenţiat după suprimarea noxei,

reducerea, în anumite cazuri, a cantității de țesut conjunctiv din ficat [867]. Date biochimice obținute din studiul fibrozelor experimentale induse prin agenți hepatotoxici, argumentează pentru posibilitatea de rezorbție a colagenului intrahepatic [188, 515, 726, 1056, 1090]. Secvența aspectelor morfologice în cursul regresiunii leziunilor debutează, aparent, cu reducerea acumulărilor intracelulare de lipide și cu diminuarea numărului de celule ductulare și interstițiale, urmate, apoi, de reducerea neoformării colagenului și de rezorbția celui deja format [1056]. Revenirea la structura aparent normală a ficatului este, în anumite condiții experimentale, impresionantă, cu dispariția totală a excesului de țesut conjunctiv. În ciroza indusă prin cazeină, colagenul hepatic atinge după 6 luni valorile de 2,94 mg pentru 100 mg de țesut, față de numai 1,44 mg la normal. Tratamentul adecvat instituit pe o perioadă de 10 luni, readuce cantitatea de colagen în limitele fiziologice [834]. În fibroza difuză consecutivă administrării de etionină, se produce o creștere a conținutului în colagen, care depășește de 4—5 ori valorile normale. Dieta cu factori lipotropi antrenează revenirea ficatului la normal, histologic și chimic, după aproximativ 2 săptămîni [512]. Catabolizarea acestei importante cantități de colagen se realizează într-un ritm de o rapiditate echivalentă celor mai active sisteme colagenolitice cunoscute în organism (uterul post partum, granulomul prin carageenină).

Prin utilizarea radioizotopilor s-a putut urmări metabolismul colagenului atît în cursul dezvoltării fibrozei, cît și în perioadele de regresiune. Astfel, de exemplu, în perioadele de fibrogeneză indusă prin administrarea de etionină, media de viață a colagenului marcat cu C_{14}-prolină a fost de 21 de zile, în timp ce, în cursul tratamentului cu factori lipotropi, s-a redus la numai 10 zile [515]. În faza tardivă a cirozei indusă prin tetraclorură de carbon, s-au evidențiat două componente colagenice: prima, prezentînd o medie de viață de aproximativ 30 de zile (*short-lived collagen*) și a doua, atingînd 230—240 de zile (*long-lived collagen*). Turnoverul mai lent al celei de a doua fracții ar reflecta tendința la ireversibilitate a leziunilor [516]. Studii histoautoradiografice au evidențiat persistența mai îndelungată a prolinei marcate în centrul septurilor fibroase, în timp ce colagenul intralobular nu mai apărea marcat [926].

Toate aceste date sugerează că reducerea excesului de colagen se realizează printr-un proces de rezorbție activă și nu apare doar ca rezultat al sistării neoformației fibrilare.

Mecanismul intim al reversibilității leziunilor nu este încă satisfăcător clarificat. Diversele ipoteze emise pînă acum încearcă să explice intensificarea catabolismului colagenului, pe de o parte prin intervenția factorilor care măresc susceptibilitatea acestei scleroproteine la degradarea enzimatică și, pe de altă parte, prin participarea unor variați fermenți, specifici și nespecifici, la procesul de degradare. S-a susținut astfel că, în procesul de reversibilitate a fibrozelor hepatice, ar juca un anumit rol: *a*) denaturarea prealabilă a colagenului, cu favorizarea acțiunii ulterioare a proteazelor specifice [88, 408, 515]; *b*) reducerea locală a pH-ului [990]; *c*) hidrolazele lizozomiale [344, 345, 512]; *d*) enzime cu acțiune specifică colagenoliti-

că [344], [345], [929]. Este probabil că, în condiţiile existenţei unor sisteme degradative active, rezorbţia colagenului neoformat să fie favorizată de faptul că acest colagen este mai puţin matur, prezentînd un grad mai redus de stabilitate structurală, datorită numărului mai mic de legături intermoleculare.

S-a sugerat că prima etapă a eliminării colagenului hepatic ar consta dintr-o denaturare enzimatică, urmată de digestie parţială prin proteaze nespecifice şi fagocitoză [515]. Determinări diferenţiate ale variatelor fracţii colagenice indică, în perioada de resorbţie, o creştere a raportului colagen solubil/colagen insolubil, prin reducerea colagenului insolubil. Sursa creşterii fracţiei solubile rezidă în transformarea celui insolubil în compuşi dializabili, probabil ca urmare a ruperii legăturilor intermoleculare [1088]. Evidenţierea unei enzime cu localizare exclusiv lizozomială şi avînd caracterul unei endohexozaminidaze, readuce în discuţie rolul glucidelor în stabilitatea structurală a fibrelor ţesutului conjunctiv şi ridică ipoteza importanţei degradării mucopolizaharidelor ca mecanism indirect de colagenoliză. Această mucopolizaharidază hepatică poate degrada acidul hialuronic, condroitin-sulfaţii A şi C, şi în mod particular, heparitin-sulfatul, component ce a fost găsit crescut în ciroze. Activitatea enzimei a putut fi corelată cu turnoverul ţesutului conjunctiv din ficat, fiind net crescută în faza reversibilă a fibrozei şi mult diminuată, pînă la 1/5 din valorile normale, în fibroza ireversibilă [512]. S-a mai demonstrat prezenţa unei enzime de tipul colagenazei în extractele de ficat uman [929] şi în cel al animalelor de laborator [344, 345]. În fibrozele hepatice s-a constatat un paralelism între creşterea activităţii enzimatice şi conţinutul în hidroxiprolină. Astfel, de exemplu, în ciroza prin tetraclorură de carbon, activitatea colagenolitică depăşeşte normalul cu 45% în stadiul de constituire a leziunilor, iar în stadiul de regresiune, cu 145% [88]. Considerată de anumiţi autori ca o catepsină de tip particular, această enzimă degradează substratul sintetic specific pentru colagen, sugerînd că ar fi vorba de o adevărată colagenază. Există şi dovezi care pledează pentru acţiunea ei asupra zonei periferice a moleculelor, respectiv a porţiunii telopeptidice [1203]. Nu se poate încă preciza dacă această enzimă este capabilă să degradeze macromolecula de colagen pînă la produşii dializabili, sau numai o denaturează, făcînd-o susceptibilă acţiunii altor fermenţi. În privinţa sediului enzimei, se sugerează că ar fi concentrată în lizozomi, întru cît activitatea ei a putut fi corelată cu aceea a fosfatazei acide [345] şi s-a constatat că este eliberată din hepatocite după administrarea vitaminei A [90].

Acţiunea izolată sau coroborată a factorilor care participă la procesul de rezorbţie a colagenului hepatic duce, în ultimă instanţă, la diminuarea mediei lui de viaţă, ceea ce explică posibilitatea reversibilităţii leziunilor de fibroză. Prin utilizarea metodologiei histochimice, cu scopul de a evidenţia gradul de stabilitate structurală a fibrelor, am atras atenţia asupra hipostabilităţii colagenului perihepatocelular şi a hiperstabilităţii celui portal [1107], [1126], [1131], [1139]. Luînd drept indici ai stabilităţii structurale susceptibilitatea colagenului, *in vitro*, la colagenază şi la agenţi cunoscuţi a rupe

Scanned with OKEN Scanner

legături electrostatice şi de hidrogen, am constatat, independent de tipul hepatopatiei, o stabilitate structurală redusă în zonele cu regenerări de parenchim şi infiltrate inflamatoare intralobulare şi un grad ridicat de stabilitate structurală în zonele cu modificări distrofice severe ale hepatocitelor sau cu necroză importantă [1140]. Interpretată în contextul datelor privind enzimele lizozomiale hepatice, corelaţia menţionată între gradul stabilităţii structurale a colagenului şi particularităţile morfofuncţionale ale celulelor din vecinătatea sa, capătă o semnificaţie deosebită. Apariţia fibrozei perihepatocelulare şi a variatelor grade de stabilitate structurală, rezultă, probabil, dintr-un dezechilibru între procesele de fibrogeneză şi fibroliză, determinat de alterările funcţionale ale celulei hepatice şi de stimulările, pe linie fibroblastică, ale elementelor kupfferiene. În perioadele în care capacitatea funcţională şi regenerarea hepatocitelor este încă dominantă, acumulările perihepatocelulare de colagen rămîn discrete şi leziunea se menţine într-un stadiu reversibil, datorită atît gradului redus de stabilitate structurală a fibrelor de neoformaţie, cît şi eficienţei activităţilor enzimatice de tip colagenolitic şi glicolitic. În perioadele în care celula hepatică devine deficitară din punct de vedere funcţional, iar stări prelungite de hipoxie orientează celulele cu capacitate de sinteză a colagenului spre o elaborare crescută a acestor macromolecule, există condiţiile apariţiei unui grad mai mare de stabilitate structurală, cu tendinţă la ireversibilitate a leziunilor.

Aceste date concordă şi cu unele rezultate obţinute prin studiul dinamicii celulare şi fibrilare cu radioizotopi; în etapele reversibile ale fibrozei hepatice experimentale se relevă valori mai reduse ale raportului hidroxiprolină/ADN, în timp ce, în stadiile ireversibile, se evidenţiază valori nai ridicate ale acestui raport [926]. Este cunoscută, de asemenea, tendinţa mai marcată la reversibilitate a fibrozelor difuze produse prin etionină, în care capacitatea de regenerare a hepatocitelor pare mult mai mare, în comparaţie, de exemplu, cu cea din fibrozele prin intoxicaţie cu tetraclorură de carbon [188, 873]. Hepatectomia parţială, la animale cu acest tip de ciroză, constituie un stimul de regenerare a celulelor hepatice şi antrenează în acelaşi timp, restabilirea concentraţiei normale de colagen în ficat; rezultatul este similar, chiar dacă hepatectomia parţială a fost efectuată în stadii mai tardive ale leziunilor, considerate ireversibile [887]. Dacă există însă importante tulburări ale circulaţiei porte, restabilirea organizării macromoleculare normale a ţesutului conjunctiv fie nu mai apare după hepatectomie, fie este incomplet realizată.

Toate aceste date sugerează că reducerea şi dispariţia excesului de fibre de colagen din ficat, este în corelaţie strînsă cu starea funcţională şi capacitatea de regenerare a hepatocitelor.

*

În tratatele recente asupra cirozelor hepatice, ca şi în unele monografii şi articole asupra acestui subiect, se menţionează următoarele patru stadii evolutive: un prim stadiu, decelabil numai prin examene clinice;

Scanned with OKEN Scanner

un al doilea stadiu, pe care îl evidenţiază şi examenele de laborator; un al treilea stadiu, susceptibil să fie diagnosticat pe baza explorărilor laparoscopice; un al patrulea stadiu, în care este solicitată şi anatomia patologică. Această orientare continuă să subestimeze posibilităţile actuale ale morfologiei, atribuindu-i acelaşi rol pe care l-a avut cu o jumătate de secol în urmă : să diagnosticheze o boală deja confirmată prin examenele anterioare, ajunsă în stadiul ireversibil de evoluţie a leziunilor. Datele prezentate au adus dovezi concludente că morfologia nu mai este în situaţia de a aştepta faza finală de dezvoltare a cirozelor, ci poate atrage atenţia asupra începutului alterărilor în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv intrahepatic încă din perioada cînd nu au apărut semne clinice importante sau de laborator. De asemenea, ea poate da indicaţii asupra gradului de reversibilitate a leziunilor, indiferent de cantitatea de material care se colorează în roşu cu picrofucsină Van-Gieson, precum şi asupra particularităţilor ultrastructurale şi metabolice ale hepatocitelor. Orientarea „preclinică" a anatomiei patologice, susţinută de noi cu ani în urmă [1098] îşi găseşte astfel un larg cîmp de afirmare în patologia hepatică.

REUMATISM

Aspectul particular al alterării ţesutului conjunctiv în reumatismul cardio-articular este *nodulul Aschoff*, o leziune exudativ-granulomatoasă, în care variatele componente constitutive se aşează mai mult sau mai puţin concentric în jurul unei zone centrale ocupată de ţesut necrotic, frecvent cu aspect de fibrinoid. La periferia focarului de necroză se găsesc acumulate histiocite cu aspect fuziform, iar în afara lor, numeroase celule de infiltraţie. În zona bogată în histiocite, care realizează imagini palisadice, se pot evidenţia şi celule gigante. În mod particular, acest tip de granulom nu conţine vase detectabile prin coloraţiile convenţionale, deşi s-a sugerat că rezultă dintr-o vasculită cu caracter exudativ-necrozant [760]. În zona de necroză s-au identificat resturi de celule, de fibre musculare şi colagene, acumulări de substanţă fundamentală alterată, de fibrină, globuline şi alte componente plasmatice extravazate. Celulele descrise de Aschoff prezintă la microscopul electronic un reticul endoplasmic bine dezvoltat, cu numeroase granule de ribonucleoproteine ataşate de membrane şi cu numeroase intercomunicări între canalicule. În schimb, aparatul Golgi, ca şi mitocondriile sînt slab reprezentate. În protoplasmă au fost identificate particule cu diametrul de 200—400 Å, înconjurate de pereţii unor vacuole. Nu se văd membrane bazale la periferia celulelor [625]. În zona de trecere de la celule spre centrul necrotic, fibrilele de colagen îşi modifică aspectul ultrastructural, prezentînd imagini de degenerescenţă granulară, subţieri, dispariţii ale periodicităţii (*fig. 71*). Nu se poate încă preciza dacă aceste efecte colagenolitice ar rezulta din eliminarea unor enzime lizozomiale din celulele cu aspect histiocitar, dar într-o zonă lipsită de vase pare singura ipoteză ce merită să fie reţinută.

Scanned with OKEN Scanner

Se consideră că prezenţa inconstantă a fibrinoidului, tumefirea în focare şi fragmentarea fibrelor fucsinofile, aspectul aparent nealterat al elementelor elastice, celulele de tip Anicikov şi Aschoff, abundenţa de limfocite, alături de prezenţa plasmocitelor şi granulocitelor neutrofile, constituie criteriile de identificare microscopică a nodulului reumatismal [1154]. Analiza histochimică a permis să se constate o metacromazie directă după coloraţia cu albastru de toluidină la pH 4,5; esterificarea cu acid sulfuric evidenţiază o metacromazie indirectă mai intensă decît în ţesutul conjunctiv normal. Materialul cromotrop nu a diminuat după incubaţie cu hialuronidază bacteriană, dar a dispărut total după acţiunea hialuronidazei testiculare [1154]. După observaţiile noastre, metacromazia directă nu dispare pînă la un pH în jur de 3 şi este reversibil blocată de metilare, sugerînd participarea grupelor sulfat. Susceptibilitatea la papaină şi la hialuronidaza testiculară a materialului extras indică prezenţa condroitin-sulfaţilor A/C sub formă de complexe mucoprotidice. Reacţia PAS semnalează, în masa de necroză şi în protoplasmele celulare, complexe glicoprotidice, susceptibile la enzime de tip tripsină sau pepsină. Reacţiile pentru tirozină, triptofan, cistină şi cisteină apar pozitive, indicînd importanţa componentei proteice în fibrinoid. Reamintim că prin metode de imunofluorescenţă s-au evidenţiat la acest nivel atît fibrinogen, cît şi imunoglobuline [760]. În faţa iniţială a leziunilor se pot detecta şi fosfolipide. Încercările de a evidenţia în nodulul reumatismal proteina de streptococ grup A, ca şi anticorpii la această proteină, precum şi la streptolizina 0, au dat rezultate negative. Este foarte greu de precizat cum evoluează nodulul, în lumina datelor de microscopie electronică şi de biochimie, corelate cu acest subiect. Astfel, determinările biochimice menţionează o cantitate „normală" de hidroxiprolină în nodulul reumatismal[129], deşi la tehnicile convenţionale apare aspect de fibroză. Pe de altă parte investigaţii ultrastructurale nu menţionează neoformări de fibrile colagene, ci prezenţa unor fibrile considerate imature, dar cu aspect electronomicroscopic nealterat, singura lor particularitate fiind diametrul mai redus decît în ţesutul conjunctiv din afara leziunii. Aceste observaţii ar sugera că aspectul de fragmentare a fibrelor fucsinofile, constatat prin metodele convenţionale, se referă doar la desfacerea acestor fibre în fibrilele constitutive, care rămîn sub această formă în masa de necroză sau la periferia ei [225]. Este, de asemenea, greu de explicat ce reprezintă fibrilele fără periodicitate, cu diametru de aproximativ 100 Å, găsite în masa de necroză a nodulului, mai ales cînd necroza apare sub aspectul de fibrinoid. În sfîrşit, mai menţionăm observaţia electronomicroscopică relevînd că celule de tip histiocitar, „normale" la tehnicile de rutină, prezintă, din punct de vedere ultrastructural, importante alterări ale organitelor şi chiar aspecte degenerative. Aceste modificări se accentuează cu cît celula este mai adînc înglobată de procesul necrotic din jur, sugerîndu-se că multe elemente din zona de necroză şi-au pierdut viabilitatea, chiar dacă la tehnicile de rutină apar clar conturate nucleul şi protoplasma. Afirmaţia de mai sus

Scanned with OKEN Scanner

se bazează pe constatarea dispariţiei organitelor celulare, singurii care rămîn timp mai îndelungat, înainte ca celula însăşi să se necrozeze, fiind lizozomii [225].

În afara nodulului, în reumatism alterarea organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv este reflectată de *variate tipuri de reacţii inflamatoare*. Întrucît nu s-a demonstrat o particularitate biochimică şi histogenetică a acestor reacţii, nu vom insista în mod deosebit asupra lor. Reamintim numai că, la nivelul endocardului predomină acumularea subendocardică a unui material bazofil, cu aspect mixomatos, susceptibil la digestia cu hialuronidază testiculară. Această acumulare a fost considerată ca făcînd parte din reacţia exsudativă nespecifică a inflamaţiei reumatice. Ulterior, în aceleaşi zone apar insule de necroză şi de fibrinoid, asociate cu scăderea intensităţii bazofiliei sau metacromaziei şi intensificarea reacţiei PAS. În plus, devin mai net pozitive testele de evidenţiere a grupelor amino şi tirozinei. Îi urmează o fază de proliferare a celulelor endocardului şi a fibroblaştilor subendocardici, cu neoformare de fibre argintofile şi apoi fucsinofile. În ţesutul de scleroză, fibrele de colagen rămîn intens PAS-reactive, sugerînd reţinerea interfibrilară de glicoproteine. La baza alterărilor organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv ar sta în primul rînd degradarea „procolagenului" din fibrele preexistente, respectiv a materialului fucsinofil ce constituie teaca externă a fibrei [1044]. Ca urmare a acestei degradări s-ar elibera mucopolizaharidele din fibre, apărînd acumularea de substanţe bazofile şi metacromatice. Ulterior se formează complexe macromoleculare patologice, înglobînd produşi locali, fibrinogen şi imunoglobuline. Astfel, în dezvoltarea alterărilor care duc, în timp, la fibrozele retractile ale valvulelor cardiace, un factor important pare a fi reprezentat de intensitatea proceselor colagenolitice din faza iniţială a reacţiei inflamatoare. Concomitent ar mai apare şi desfacerea complexelor mucoprotidice din substanţa fundamentală, contribuind la creiarea unui grad accentuat de hipostabilitate structurală a tuturor componentelor ţesutului conjunctiv din zona lezată. Rezultă o redistribuire a mucopolizaharidelor acide rămase libere, favorizînd alcătuirea de complexe macromoleculare patologice. Procesul de liberare a mucopolizaharidelor acide, atît din fibre cît şi din combinaţii cu proteinele, explică creşterea importantă a hexozaminelor în faza iniţială a inflamaţiei şi diminuarea lor progresivă pe măsură ce se instalează procesul de fibroză [778]. S-a sugerat că se poate aprecia gradul de evolutivitate a leziunilor după cantitatea de mucopolizaharide prezente în interstiţii [1045]. De asemenea, ca factor care determină importanţa reacţiei inflamatoare şi mai ales a acumulărilor iniţiale de mucopolizaharide a fost incriminată intensitatea hipersensibilizării. În afara proceselor distructive menţionate, la acumularea mucopolizaharidelor ar contribui şi o potenţare a sintezei lor în anumite elemente de tip embrionar, denumite „mucogene" [816].

La nivelul miocardului s-a descris următoarea succesiune a alterărilor organizării macromoleculelor din interstiţiile conjunctive în cursul inflamaţiei reumatismale [815]: a) într-o primă fază, ar creşte permeabilitatea

locală, în special ca urmare a eliberării de enzime de tip hialuronidazic, favorizîndu-se acumulări de exsudat; *b*) în prezenţa acestei acumulări apare, într-o a doua fază, o creştere locală a sintezei de acid hialuronic, menţinîndu-se însă accentuată activitatea locală a hialuronidazelor, ceea ce duce treptat la depolimerizarea acestui acid şi la imposibilitatea refacerii unei substanţe fundamentale normale; *c*) în faza a treia, apar complexe macromoleculare anormale între componentele locale şi cele extravazate, vizualizate sub aspect de zone necrotice, fibrinoid etc.

În afara cordului, unde evoluţia leziunilor poate duce atît la scleroze valvulare, cît şi la scleroze intramiocardice, inflamaţia reumatismală lezează sinovialele articulare, vasele, creierul, plămînii, rinichii etc. La baza acestor leziuni stau arteriolitele necrozante sau alte tipuri de vasculite, cu sau fără acumulare de fibrinoid în peretele arteriolar, cu sau fără asociere de tromboze, precum şi importante infiltrate cu celule rotunde (denumire ce desemnează limfocite, celule limforeticulare, celule reticulare mici, monocite şi alte elemente greu de identificat). În rinichi, ficat, testicul, suprarenală şi sistem nervos central, aceste infiltraţii mimează, uneori, periarterita nodoasă.

În reumatism şi, în special, în afecţiunea denumită *artrită reumatoidă*, de o importanţă deosebită, sînt alterările în organizarea macromoleculară a sinovialei.

Sub denumirea de sinovială definim un tip special de organizare a ţesutului conjunctiv, alcătuind o membrană care se interpune pe faţa internă a capsulei articulare, în jurul burselor şi al inserţiilor tendoanelor, oprindu-se la nivelul cartilajelor articulare, singurele structuri netapisate. În compoziţia membranei intră în mod predominant: ţesutul conjunctiv lax, în zonele în care, în cursul mişcărilor articulare se produce o alunecare a epiteliului pe formaţiunile subiacente; ţesutul conjunctiv fibros, în zonele expuse la presiuni şi tracţiuni; ţesutul adipos, în zonele ce se extind spre teritoriile unde începe frecarea suprafeţelor articulare. Celulele de înveliş formează o intimă, iar formaţiunile subjaeente o subintimă, în general intens vascularizată. La microscopul electronic s-au individualizat în intimă două tipuri de celule: superficiale, denumite şi A (dotate în special cu capacităţi fagocitare) şi profunde, denumite şi B, orientate secretor spre sinteza acidului hialuronic. Sinteza de acid hialuronic reprezintă particularitatea funcţională dominantă a sinovialei, întrucît el se adaugă dializatului plasmatic spre a constitui lichidul sinovial, cu rol esenţial în lubrefierea suprafeţelor articulare. În plus, acelaşi fluid ar asigura şi nutriţia interstiţială a cartilajelor articulare (în general lipsite de vase) prin acelaşi mecanism de formare a unui film subţire şi continuu la suprafaţa lor. Graţie existenţei unei substanţe fundamentale bogate în acid hialuronic cu un grad ridicat de polimerizare, sinoviala constituie un filtru selectiv permeabil, care asigură un anumit patern în compoziţia chimică a lichidului sinovial. Numeroase lucrări au demonstrat că permeabilitatea creşte şi devine neselectivă, cu cît scade gradul de polimerizare a acidului hialuronic. De aceea, toţi factorii care acţionează în sensul diminuării, la nivelul sinovialei, a stabilităţii structurale a acestui muco-

Scanned with OKEN Scanner

polizaharid, pot modifica, în mod indirect, compoziţia lichidului sinovial. Vîscozitatea lichidului sinovial pare dependentă de concentraţia şi gradul de polimerizare a acidului hialuronic, indiferent de prezenţa sau absenţa proteinelor din complexul mucoproteic. Astfel, după digestii cu tripsină sau chimotripsină se pot elimina 65% din proteinele fluidului sinovial, fără ca această rupere a legăturilor acid hialuronic-proteine să altereze vîscozitatea lichidului [811]. În schimb, vîscozitatea fluidului sinovial scade ireversibil în cursul acidifierii soluţiei, mai ales la pH 4—3 [859]. Întrucît nu au existat pînă acum dovezi concludente asupra corelaţiei dintre alterările lichidului sinovial, capacităţile funcţionale ale celulelor sinovialei, stadiul evoluţiei leziunilor şi durata bolii, nu vom insista asupra acestui subiect, limitîndu-ne să menţionăm scăderea gradului de polimerizare a acidului hialuronic în cursul artritei reumatoide [54]. Este probabil că, la apariţia acestui grad redus de polimerizare contribuie atît celulele, care sintetizează o substanţă cu greutate moleculară mai mică, cît şi factori locali, care degradează mucopolizaharidul din lichidul sinovial. *In vitro*, atît extractele de granulocite neutrofile, cît şi cele de membrană sinovială de la pacienţi cu artrită reumatoidă, produc o scădere marcată a vîscozităţii lichidului sinovial, ca şi a substanţei fundamentale a cartilajului [1219]. Mecanismul de acţiune ar fi bazat, în primul rînd, pe efectele degradante ale enzimelor lizozomale [1172], labilizate în cursul reacţiilor imune [39]. Tratamentele cu cortizon şi ACTH refac normostabilitatea lichidului sinovial, atît prin inhibarea sintezei unui acid hialuronic slab polimerizat şi reapariţia unei elaborări normale, cît şi prin stabilizarea membranelor lizozomale din celulele sinovialei şi din infiltratele inflamatoare.

Analiza histochimică a modificărilor apărute o dată cu dezvoltarea artritei reumatoide în sinovială au constituit unul dintre subiectele preocupărilor noastre recente. Aceste investigaţii au demonstrat că: *a*) la nivelul *celulelor intimei*, elementul particular îl constituie alternanţa teritoriilor cu reactivităţi histochimice complexe, cu teritoriile cu predominanţa unui singur tip de reactivitate histochimică, sau total lipsite de această reactivitate. Astfel, se întîlnesc zone ale intimei în care protoplasma celulelor sinoviale conţine cantităţi variabile de acid hialuronic, acid sialic, ribonucleoprotroteine, proteine bogate în tirozină şi în aminoacizi bazici, glicoproteine, glicolipide şi hemosiderină; intricate cu acestea, apar zone în care celulele intimei conţin doar acid hialuronic, sau acid hialuronic şi acid sialic, sau numai ribonucleoprotine sau glicoproteine; *b*) la nivelul *substanţei fundamentale*, predomină acumularea anormală de acid hialuronic (*fig. 72*), asociată cu numeroase capilare de neoformaţie, sediul unor frecvente microhemoragii; în alte teritorii, materialul bazofil dispare numai după incubaţii succesive cu hialuronidază şi sialidază, ca şi după extracţii cu enzime proteolitice, sugerînd prezenţa unor complexe acid hialuronic-sialoproteine (*fig. 73*). În sfîrşit, în alte teritorii am evidenţiat substanţe fundamentale „de substituţie", sau nefuncţionale, descrise anterior, ultimele sub aspect microscopic de fibrinoid şi hialin. De reţinut constatarea că substanţa fundamentală nu a putut fi evidenţiată histochimic în zonele bogate în infiltrat inflamator; *c*) la nivelul

Fig. 71. Aspect eectronomicroscopic al fibrelor de colagen din diferite regiuni ale unui nodul reumatic. a) Zonă periferică aparent cicatrizată. b) Zonă din jurul focarului de necroză, cu fibrile alterate. c) Zonă centrală de necroză cu dispariţia fibrilelor (după ASTBURY şi colab.,din HARTMAN [465]).

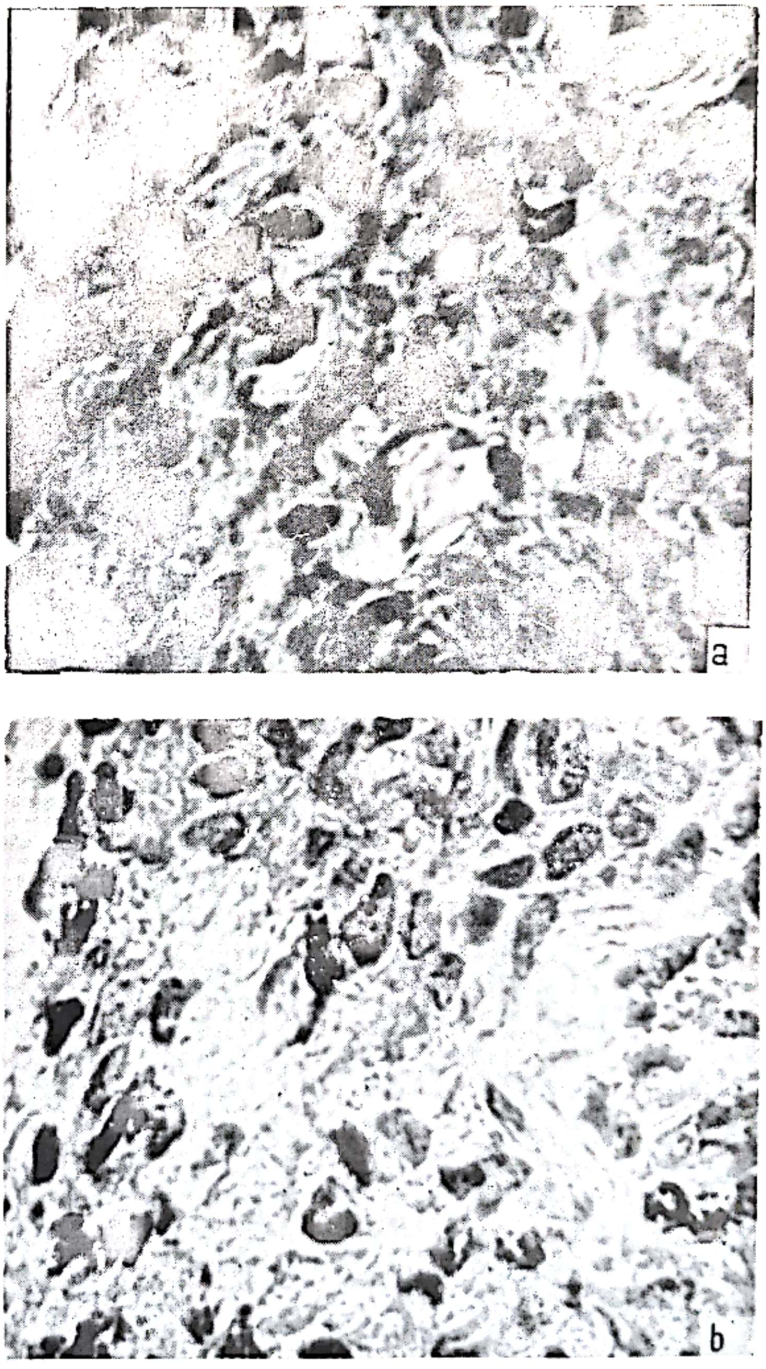


Fig. 72. Sinovială de artrită reumatoidă. a) Acumulare anormală de material metacromatic în intimă şi zona subintimală. b) Dispariţia totală a substratului metacromatic după digestie cu hialuronidază bacteriană, indicînd acidul hialuronic ca substrat reactiv (× 220).

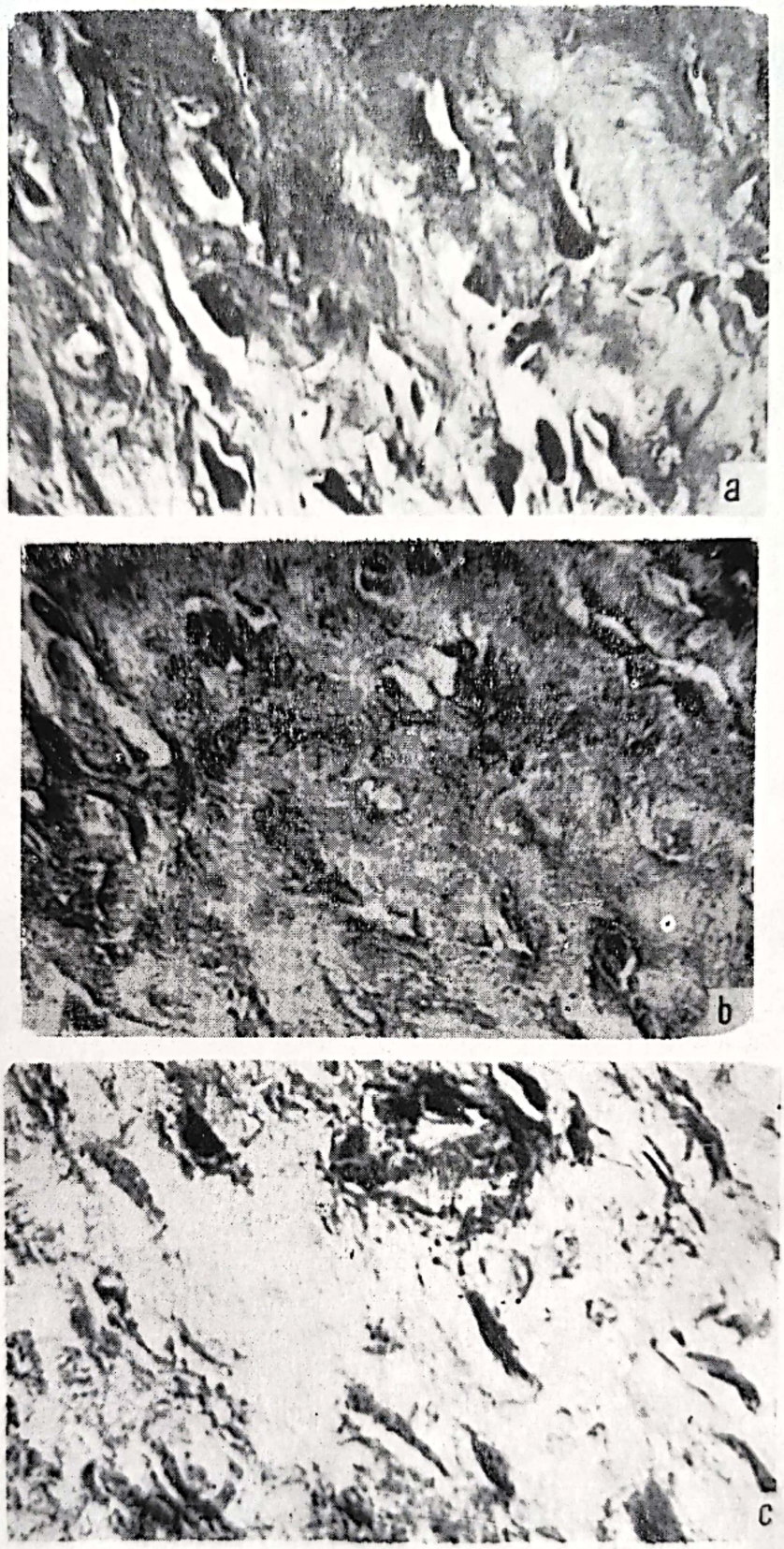


Fig. 73. Sinovială de artrită reumatoidă. Evidenţierea unei substanţe fundamentale de tip particular, protejată steric de acidul sialic. a) Material cromotrop în substanţa fundamentală a zonei subintimale. b) Discretă eliminare a acestui material, după digestie de 10 minute cu tripsină. c) Intensă eliminare a aceluiaşi material, după 10 minute de digestie cu tripsină, precedată de incubaţie cu sialidază (VELICAN C. şi STROESCU [1130]).

Scanned with OKEN Scanner

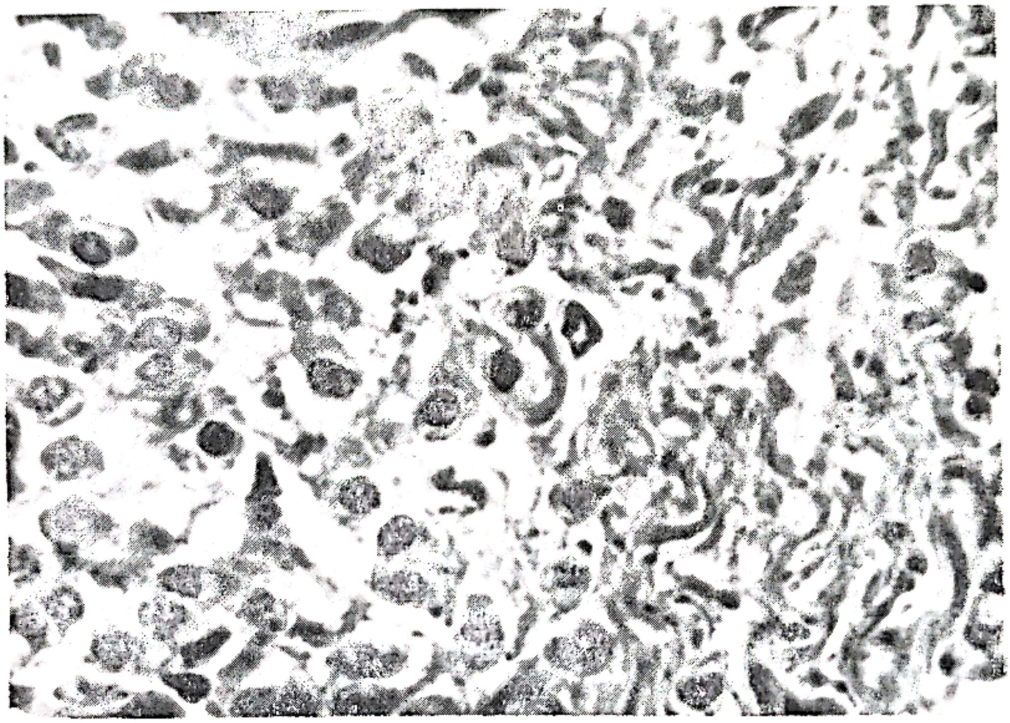


Fig. 74. Sinovială de artrită reumatoidă. Absenţa neoformării de fibre de colagen în zona cu infiltrat inflamator şi abundenţa neoformării acestor fibre în zonele fără infiltrat inflamator (× 880).

Scanned with OKEN Scanner

fibrelor, apar modificări în stabilitatea lor structurală, legate de asemenea de prezenţa infiltratului inflamator. În toate zonele unde infiltratul era abundent şi conţinea şi granulocite neutrofile, digestia cu colagenază, ca şi soluţiile ce rup legături electrostatice şi punţi de hidrogen, dezagregau mult mai rapid fibrele fucsinofile decît în teritoriile fără infiltrate (*fig. 74*). Date în curs de publicare demonstrează existenţa unei relaţii, statistic semnificative, între bogăţia în celule de infiltraţie şi gradul redus de stabilitate structurală a fibrelor [1130]. Observaţiile noastre au permis să se constate că la toţi bolnavii cu artrită reumatoidă analizaţi, există zone întinse de excludere funcţională a sinovialei, în care orientarea secretorie şi metabolică nu mai este în direcţia elaborării de acid hialuronic, necesar lichidului sinovial şi asigurării unei permeabilităţi adecvate. Întrucît metabolismul acidului hialuronic în lichidul articular este reflectat de un turnover destul de rapid, necesitînd înlocuirea la 3—7 zile, a macromoleculelor constitutive, capacitatea de sinteză a complexului hialuronat-proteină pare a fi menţinută pe baza unei regenerări neadecvate şi continue a sinovialei, exteriorizată prin procesul de proliferare viloasă. În condiţii fiziologice, sinovectomia chirurgicală determină apariţia unei regenerări compensatorii, cu restabilirea aceluiaşi patern anatomic şi funcţional. În condiţiile artritei reumatoide, procesele inflamatorii şi, mai ales, cele imunologice determină excluderi funcţionale periodice ale unor teritorii întinse, solicitînd noi procese adaptative regenerative, care duc la o considerabilă dezvoltare a sinovialei. De aceea, ablaţia chirurgicală se impune ori de cîte ori există o discordanţă importantă între marea masă de sinovială regenerată şi capacitatea ei funcţională redusă. O a doua constatare, rezultată din analizele noastre, este observaţia că, în cursul procesului de regenerare compensatorie a sinovialei, apar acumulări nefiziologice de acid hialuronic, creind zone cu aspect de ţesut mucoid, precum şi o stimulare inadecvată a neoformării de capilare, constatată de noi şi la nivelul plămînilor după instilaţii de acid hialuronic [1121]. Capilarele de neoformaţie au un perete foarte fragil, favorizînd apariţia exsudatelor, hemoragiilor şi acumulărilor de proteine sanguine. Anumite aspecte microscopice sugerează că celulele sinovialei încep să fagociteze acidul hialuronic acumulat în cantităţi nefiziologice. Importanţa tulburărilor locale, determinate de sinteza neadecvată de acid hialuronic, ar putea fi apreciată prin prizma unor rezultate terapeutice satisfăcătoare, obţinute la anumite cazuri, după administrarea de hialuronidaze sau alte mijloace terapeutice care degradează acidul hialuronic, cum ar fi razele X, ultraviolete, ultrasunetele etc. A treia constatare a lucrărilor noastre este importanţa infiltratului inflamator ca factor de modelare a evoluţiei procesului morbid. Acest infiltrat, prin bogăţia enzimelor lizozomale pe care le eliberează, sau prin alte mecanisme încă neprecizate, împiedică dezvoltarea fibrozei, menţinînd fibrele de colagen într-un grad redus de stabilitate structurală. Analize biochimice au atras atenţia asupra deficienţei numărului de legături intermoleculare în fibrele de colagen ale sinovialei din artrita reumatoidă [1036], aducînd astfel un argument în favoarea analizelor noastre histochimice (*fig. 75*). În sfîrşit, în sprijinul acestei observaţii

Scanned with OKEN Scanner

pledează şi existenţa a numeroase artrite reumatoide cu puseuri inflamatoare repetate timp de 10—15 ani şi care nu ajung la anchiloza articulaţiei respective, în timp ce în alte cazuri, fără semne clinice de inflamaţie, anchiloza apare extrem de rapid. Efectele infiltratului inflamator nu trebuiesc însă limitate doar la inhibarea fibrilogenezei. Absenţa proliferărilor sinoviale la animalele devenite leucopenice prin administrare de

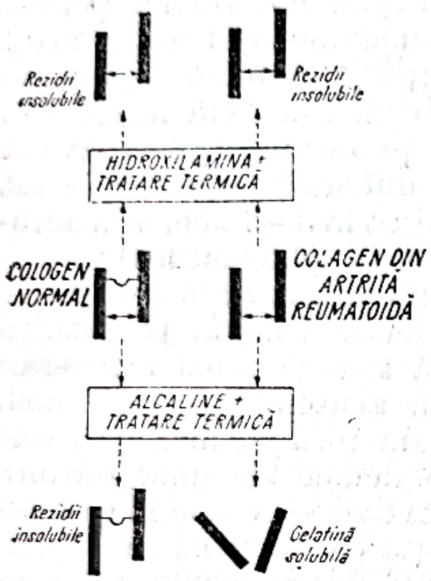


Fig. 75. Spre deosebire de fibrilele normale de colagen interconectate prin legături susceptibile, în parte, la hidroxilamină şi, în parte, la soluţii alcaline, fibrilele de colagen din sinoviala de artrită reumatoidă nu mai sînt legate decît prin conectări susceptibile la alcaline. De aceea, tratate cu soluţii alcaline vor da naştere la o gelatină solubilă, pe cînd cele normale, rămînînd în parte unite prin legăturile susceptibile la hidroxilamină, vor forma un rezidiu insolubil (STEVEN [1036]).

azot-iperită, sugerează că leucocitele influenţează, prin produşii eliberaţi, şi hiperplazia elementelor sinoviale [488]. De asemenea, capacitatea streptolizinei S de a induce artrita a fost în mare parte corelată cu efectul de eliberare de enzime lizozomiale din celulele de infiltraţie [1174]; efectul de eliberare a enzimelor din granulocite a fost atribuit şi complexului gamma globulină antigenică-anticorp (factor reumatoid) după ce a fost fagocitat de macro- şi microfage [1226]. Nu intrăm în amănuntele acestor mecanisme patogenice, întrucît depăşesc, prin complexitatea lor, subiectul lucrării noastre. Nu vom insista nici asupra histogenezei fibrinoidului din artrita reumatoidă şi a naturii complexelor antigen-anticorp acumulate sub aspectul hialinului, întrucît am fi nevoiţi să repetăm o serie de date menţionate în paginile anterioare.

OTOSCLEROZA

Sub această denumire se defineşte o alterare gravă în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv din capsula labirintică şi cea a oscioarelor urechii medii, determinînd surditate, la un număr impresionant de mare de tineri, adulţi şi bătrîni. Este vorba de o afecţiune caracteristică patologiei umane, frecvent bilaterală, afectînd ambele capsule cu o intensitate similară; pare net agravată de anumite condiţii fiziologice,

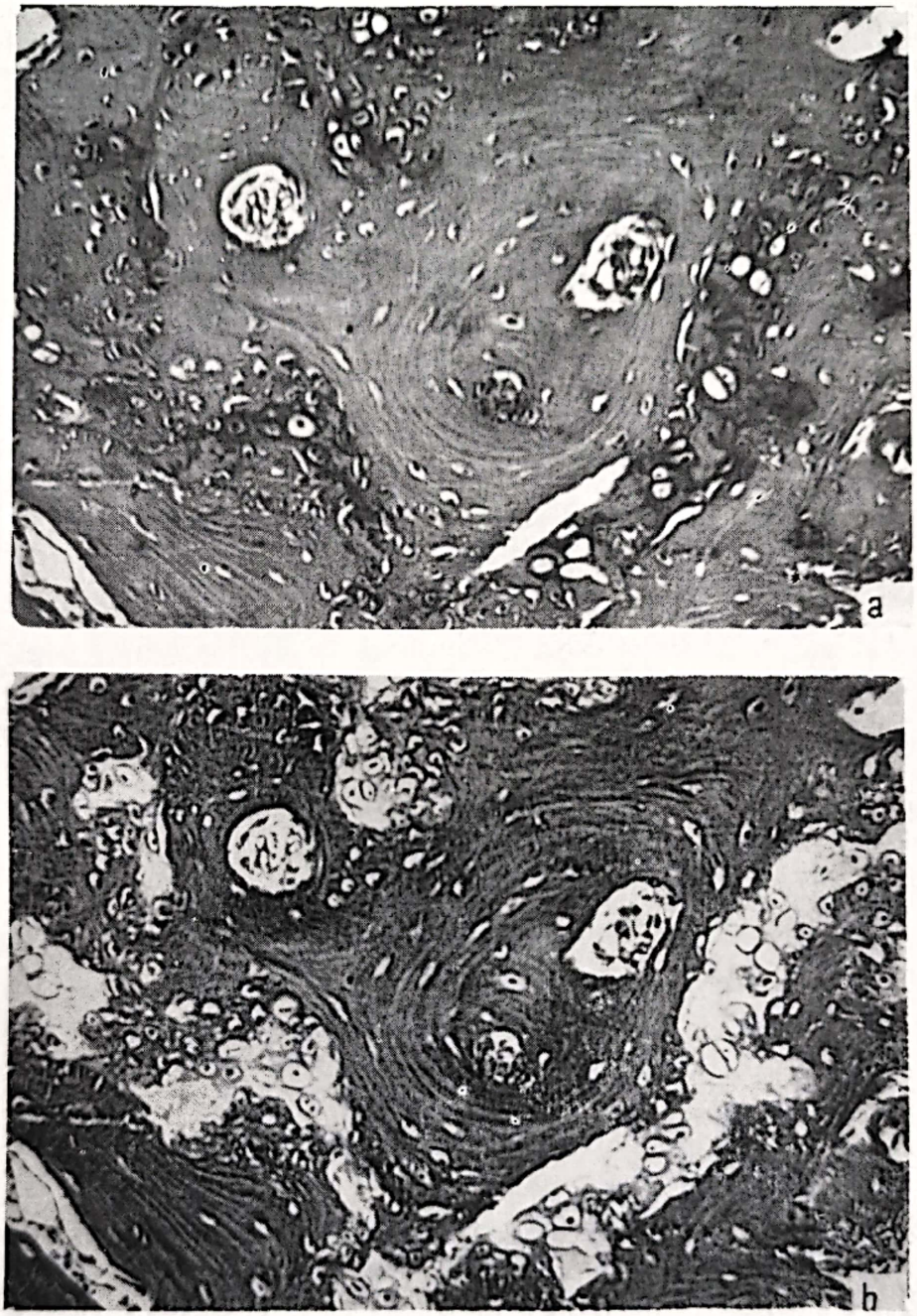


Fig. 76. a) „Resturi" de cartilaj embrionar în matricea osoasă, evidenţiate prin metacromazia la albastru de toluidină. b) Dispariţia materialului cromotrop după digestie cu papaină (VELICAN C. şi CINCA [1129], reprodus cu permisiunea editurii Almqvist).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 77. Platina scăriţei. a) Dispariţia fibrelor fucsinofile din matricea osoasă, după digestii succesive cu sialidază-colagenază. b) Persistenţa aceloraşi fibre, dacă, înaintea digestiilor enzimatice, s-au introdus legături intermoleculare artificiale prin tratare cu formol (VELICAN C. şi CINCA[1129], reprodus cu permisiunea editurii Almqvist).

Scanned with OKEN Scanner

cum ar fi sarcina, lactaţia sau menopauza. Nu se cunoaşte factorul, sau factorii etiologici, nici mecanismele patogenice. De aceea, nu există nici tratamente profilactice şi nici nu poate fi oprită evoluţia bolii, singurele rezultate satisfăcătoare fiind bazate pe intervenţii chirurgicale.

Histogeneza otosclerozei apare foarte interesantă de studiat, în lumina ipotezei noastre, privind rolul alterărilor stabilităţii structurale a macromoleculelor în patogenia bolilor [1124, 1125, 1128, 1131]. În cursul vieţii embrionare, capsula labirintică se dezvoltă ca o acumulare de celule mezenchimale care se transformă în cartilaj, iar, ulterior, suferă o mineralizare rapidă. În timp ce se formează osul, capsula cartilaginoasă primitivă suferă un proces de liză, care nu are, însă, un caracter total. În consecinţă, rămîn incluse în masa osoasă mici insule de cartilaj embrionar, care pot fi evidenţiate şi în oscioarele urechii medii. Aceste două particularităţi ontogenetice, osificare rapidă ce pare, uneori, terminată la naştere şi păstrarea, în structurile mineralizate, a unor resturi din cartilajul primitiv, influenţează în mod evident organizarea macromoleculară a capsulei labirintice, zonele de hiperstabilizare structurală, alternînd cu cele de hipostabilizare [81].

Încercările noastre de a determina, *in vitro*, un proces de degradare a matricei osoase a platinei, asemănător celui ce apare *in vivo* în cursul fazei incipiente a otosclerozei, ne-au permis să demonstrăm că această degradare nu se produce decît sub acţiunea colagenazei şi, numai, pe secţiunile din care, în prealabil, s-a eliminat acidul sialic [1122]. Tratamentele cu diverse tampoane acide sau alcaline, cu enzime glicolitice de tipul amilazei, hialuronidazei, beta-glucuronidazei, lizozimului, sau proteolitice de tipul pepsinei, tripsinei şi papainei, acţionînd izolat sau anterior digestiei cu colagenază, nu au dat rezultate pozitive. Raportînd aceste observaţii la datele care au demonstrat capacitatea osteoblaştilor de a elabora enzime cu efect de colagenază, precum şi la obişnuita prezenţă a unor fermenţi de tipul sialidazei în lizozomi, se ajunge la o nouă ipoteză privind mecanismul prin care pot să apară focarele de osteoliză. În plus, am atras atenţia şi asupra posibilităţilor unor acţiuni temporare, nefiziologice, ale unor sialidaze şi colagenaze, elaborate de flora microbiană patogenă, mai ales cea colonizată în cavitatea bucală sau nazo-faringiană. Menţionăm că o astfel de floră a fost incriminată în liza smalţului [137], intervenind, pe lîngă procesul de osteoliză, şi o acţiune de chelare [946]. Dacă această ipoteză ar fi verificată, apare o nouă perspectivă de profilaxie a otosclerozei, prin eradicarea anumitor flore microbiene ce pululează în cavitatăţile bucală şi nazofaringiană. În acelaşi timp, am obţinut, *in vitro*, liza resturilor de cartilaj embrionar, atît prin digestie cu hialuronidază testiculară, cît şi cu papaină (*fig. 76*) ceea ce pledează, de asemenea, pentru hidroliza enzimatică, drept mecanism iniţial al apariţiei focarelor de otoscleroză. Studii ulterioare ne-au permis să demonstrăm că tratarea cu sialidază-colagenază a matricelor arcurilor scăriţei, ca şi a ciocanului şi nicovalei, nu a determinat procesul de liză, constatat la nivelul platinei [1123], sugerînd un tip special de organizare macromoleculară a zonelor susceptibile la osteoliză. El se caracterizează, în lumina rezultatelor cercetărilor noastre,

Scanned with OKEN Scanner

prin prezenţa acidului sialic, ca principalul ciment stabilizator al fibrilelor de colagen, aglomerate în fibre fucsinofile. Datorită grupelor sale carboxil, acidul sialic exercită, probabil, o acţiune de protecţie sterică, împiedicînd centrul activ al enzimei de tip colagenazic să atace macromolecula de colagen. Înlăturarea acidului sialic, ca urmare a digestiei cu sialidază, a dus la dispariţia acestui factor de protecţie sterică şi colagenul a fost rapid degradat de colagenază. Analiza gradului de stabilitate structurală a fibrelor de colagen, din diferite zone ale oscioarelor urechii medii, din platină şi din capsula labirintică ne-a permis să demonstrăm că, în teritoriile susceptibile să fie sediul leziunilor de otoscleroză, colagenul rămîne, şi la adult, cu un număr mai redus de legături intermoleculare, în comparaţie cu zonele unde nu apar leziunile. Dimpotrivă, introducerea de legături transversale artificiale între macromoleculele de colagen, ca urmare a pretratării cu acid tanic sau formaldehidă, a făcut să dispară diferenţa de stabilitate structurală (*fig. 77*), aducînd un argument în plus că ea pare să fie determinată de o deficienţă constantă în procesul de maturare a fibrelor [1129].

BOLI EREDITARE

Entităţile anatomo-clinice care vor fi prezentate sînt extrem de rar întîlnite în practica medicală. Totuşi, ele trezesc un interes deosebit prin posibilităţile de a se analiza alterarea metabolismului mucopolizaharidelor, colagenului sau elastinei, în lumina deficienţelor de ordin genetic, reflectate în elaborarea unor enzime ce catalizează sinteza şi degradarea acestor substanţe.

Pentru „mucopolizaharidozele ereditare" s-au propus mai multe tipuri de **clasificări,** dintre care vom menţiona numai două. Prima, le asociază după modelul glicogenozelor, luînd drept criterii atît particularităţile genetice, cît şi pe cele clinice şi biochimice [722] : I. *Sindromul Hurler*, cu alterarea metabolismului condroitin-sulfatului B şi al heparitin-sulfatului ; II. *Sindromul Hunter*, tot cu alterarea metabolismului condroitin-sulfatului B şi heparitin-sulfatului ; III. *Sindromul Sanfilippo*, cu alterarea metabolismului heparitin-sulfatului ; IV. *Sindromul Morquio*, cu alterarea metabolismului keratosulfatului ; V. *Sindromul Scheie*, cu alterarea metabolismului condroitin-sulfatului B. La această clasificare s-a adăugat şi VI. *Sindromul Maroteaux*, tot cu alterarea metabolismului condroitin-sulfatului B [705].

A doua propunere de clasificare reuneşte nu numai bolile cu o netă componentă genetică, ci şi pe cele cu o participare mai puţin importantă a factorilor ereditari [730]. Prezentăm această clasificare, cu menţionarea, în paranteză, a mucopolizaharidului eliminat prin urină :

— *Mucopolizaharidoze certe* : gargoilismul (condroitin-sulfat B şi heparitin-sulfat) ; boala Morquio-Ullrich (condroitin-sulfat, acid hialuronic

şi/sau keratosufat depolimerizat); boala Morquio-Brailsford (condroitin-sulfaţi ?); mastocitozele (heparitin-sulfat şi acid hialuronic).

— *Mucopolizaharidoze posibile*: artro-osteo-onichodisplazia (acid hialuronic); exsostoza multiplă ereditară (condroitin-sulfat A); sindromul Marfan (condroitin-sulfaţi); hipertrofia musculară congenitală (nespecificat); boala Farber (mucopolizaharid acid nesulfatat, anormal).

— *Mucopolizaharidoze asociate*: artrita reumatoidă, lupusul eritematos diseminat, mielomul, hepatopatiile grave, hipotiroidismul netratat (caracterizate printr-o slabă creştere a unor mucopolizaharide, prezente, în mod normal, în ţesuturi).

Aceste clasificări sînt departe de a fi mulţumitoare, datorită marilor lacune care există în cunoaşterea mecanismelor patogenice ale bolilor respective. Este probabil ca cele mai multe dintre ele să fie afecţiuni rezultînd din deficienţe lizozomale de ordin genetic. Apar dereglări în procesele de catabolism şi de acumulare intracelulară, reflectate prin aspecte de tezaurizare. Manifestarea clinică poate avea un caracter general, ca în sindromul Hurler (pe care îl vom descrie mai amănunţit) sau un caracter local, ca în distrofia maculară a corneei, determinată de acumulări de mucopolizaharide în fibroblaştii locali, apărînd sub formă de vacuole multiple aparţinînd reticulului endoplasmic; în urină nu se elimină substanţe anormal crescute, iar, în alte teritorii ale organismului, fibroblaştii au un aspect ultrastructural normal [578]. Cînd, însă, mucopolizaharidoza are un caracter general, urinile pot apărea metacromatice, iar culturile de fibroblaşti permit să se constate că aproximativ 10% prezintă o protoplasmă metacromatică. În pielea normală, dimpotrivă, toţi fibroblaştii sînt ortocromatici. Testul respectiv este valoros pentru diagnosticul sindromului Hurler, Hunter şi Sanfilippo [252]. S-a atras, de asemenea, atenţia asupra valorii diagnostice a incluziilor metacromatice din unele limfocite şi monocite, decelabile prin simpla colorare a frotiurilor de sînge periferic [749]. În sfîrşit, biopsia de cartilaj poate furniza multiple informaţii, utile pentru diagnostic şi aprecierea evolutivităţii bolii [144].

Sindromul Hurler (gargoilismul) este caracterizat, din punct de vedere histochimic, printr-o acumulare difuză de mucopolizaharide acide, care rezistă la digestiile cu hialuronidază testiculară. Metacromazia acestor substanţe persistă, după fixare în Carnoy, pînă la un pH de 3,5 şi, după fixare în formol, pînă la un pH de 2,5. Este ireversibil blocată prin metilare. Procesul de tezaurizare mucopolizaharidică apare mai ales în interstiţiile ficatului, splinei, rinichilor, ganglionilor limfatici, prehipofizei şi sistemului nervos central, invadînd, ulterior, şi parenchimele respective. Puţine boli ereditare au la bază modificări atît de severe şi de dramatice, ca cele determinate de aceste acumulări anormale de mucopolizaharide acide. Copiii, aparent normali la naştere, devin, într-un interval de cîţiva ani, întîrziaţi mintal, prezintă deformaţii ale scheletului, hepato- şi splenomegalie, precum şi grave tulburări de vedere şi de auz. La examenul necropsic, ateroscleroza aortei şi a coronarelor este impresionantă, deşi nu se poate detecta o anomalie în metabolismul colesterolului. Pe secţiuni, domină

Scanned with OKEN Scanner

prezenţa celulelor gargoilice, denumire sub care sînt desemnate elemente multivacuolate, încărcate cu mucopolizaharidul circulant. La microscopul electronic, vacuolele, cu diametru ce depăşeşte uneori 10 μ, conţin incluzii polimorfe, cu aspecte extrem de variate [1089]. Similitudinea cu vacuolele care apar după administrare experimentală de dextran sau triton WR 1939, a sugerat ipoteza că ar fi vacuole de natură lizozomală. S-a afirmat, pe baza acestor observaţii, că, la individul normal, mucopolizaharidele acide pătrund în lizozomi, unde sînt catabolizate ; la cazurile cu gargoilism, absenţa probabilă a unei enzime care cataliza această hidroliză, duce la acumularea progresivă a substanţei necatabolizate. O altă ipoteză susţine că echipamentul enzimatic al lizozomilor ar fi normal, dar mucopolizaharidul care pătrunde în vacuole are o constituţie chimică ce împiedică enzima respectivă să-l catabolizeze. Indiferent de mecanismul susţinut, prezenţa mucopolizaharidelor în lizozomi pare să fie din ce în ce mai larg acceptată, în toate cazurile de sindrom Hurler studiate [615].

O primă încercare de a explica patogenia bolii Hurler s-a bazat pe aşa-zisa „metaplazie chimică" a fibroblaştilor [733]. Conform acestei ipoteze, fibroblaştii, în loc să sintetizeze acid hialuronic şi condroitin-sulfaţi A/C, suferă o diferenţiere funcţională şi încep să producă cantităţi anormale de condroitin-sulfat B şi heparitin-sulfat. În culturi de ţesuturi, fibroblaştii continuă să elaboreze aceste mucopolizaharide neobişnuite, timp de 28 de săptămîni [945]. Administrarea de acid ascorbic a mărit ritmul de sinteză, sugerînd autorilor menţionaţi că defectul principal ar fi intensitatea epimerizării acidului glucuronic în acid iduronic. Pe de altă parte, s-a demonstrat că atît condroitin-sulfatul B, cît şi heparitin-sulfatul ce se acumulează în ţesuturi, prezintă un deficit al legăturii lor cu proteinele. Astfel, în pielea umană normală, după procesul de proteoliză, rămîne cîte un rezidiu de serină pentru fiecare lanţ polizaharidic. La bolnavii cu sindrom Hurler s-a găsit un rezidiu de serină, pentru cinci lanţuri polizaharidice [285], sugerînd că defectul genetic constă în instabilitatea legăturii mucopolizaharid-proteină prin intermediul serinei, permiţînd o mobilizare mai rapidă a fracţiei glucidice a complexului mucoprotidic. Defectul de legătură mucopolizaharid-proteină a apărut şi din studiul heparitin-sulfatului, acumulat în boala Hurler [284]. Alte ipoteze sugerează o excesivă degradare a proteinelor în lizozomi, cu eliberarea mucopolizaharidelor care, apoi, difuzează în circulaţia generală [1064]. Aşa s-ar explica de ce, în ţesutul normal, heparitin-sulfatul are o greutate moleculară de 24 000—29 000, iar în ţesutul cu gargoilism, doar 2 700—5 500. Diminuarea greutăţii moleculare ar rezulta dintr-un proces de degradare, apărut în urma absenţei fracţiei proteice, necesare formării complexului mucoprotidic. În acelaşi sens pledează şi rezultate obţinute în urma administrării de puromicină, care blochează sinteza fracţiei proteice [581].

În încheierea acestor consideraţii asupra patogeniei gargoilismului, menţionăm că, de cele mai multe ori, este vorba de o tezaurismoză mixtă, reflectată prin prezenţa de material PAS-reactiv, alături de substratul metacromatic. În materialul PAS-reactiv s-au identificat hexoze, hexozamine, acizi graşi, sfingozină, acid sialic etc., incluse într-un complex

Scanned with OKEN Scanner

glicolipidic, care stabileşte puntea de legătură între mucopolizaharidoze şi lipoidoze.

Sindromul Marfan este, de asemenea, caracterizat prin acumulări generalizate de mucopolizaharide acide, fiind însă vorba de un substrat digerat de hialuronidaza testiculară. Acumulările cele mai mari sînt menţionate la nivelul valvulelor cardiace şi al endocardului parietal. Anomalia metabolică se referă la condroitin-sulfatul C [139] şi ar putea fi datorită: *a*) unui proces de hipersinteză; *b*) absenţei degradării unui material elaborat în cantităţi fiziologice; *c*) producerii unui mucopolizaharid anormal, care rezistă mecanismelor fiziologice de catabolizare. În afara condroitin-sulfatului C, se mai menţionează acumulări anormale de keratosulfat în cartilaj [111]. Mecanismul patogenic este necunoscut, sugerîndu-se, pe primul plan, o deficienţă a legăturilor mucopolizaharid-proteină, ca şi în sindromul Hurler. S-a mai incriminat absenţa condroitin-sulfatazei. În mod deosebit subliniem că defectul genetic nu este limitat la acumularea unui mucopolizaharid în ţesuturi, ci interesează întreaga organizare macromoleculară a ţesutului conjunctiv. Astfel, s-a notat o alterare funcţională şi morfologică a fibrelor elastice din vase, piele şi plămîni şi o reducere a numărului de legături intermoleculare dintre fibrele de colagen, sugerîndu-se că aceste modificări ar fi determinate de o substanţă fundamentală anormal de bogată într-un anumit tip de mucopolizaharid [312]. Gradul redus de stabilitate structurală a colagenului a explicat prezenţa în urină a hidroxiprolinei, în cantităţi ce depăşesc eliminările normale. Aceste observaţii au dus la ipoteza existenţei unor mecanisme patogenice comune în sindromul Marfan şi latirism [928].

Întrucît celelalte boli ereditare ale ţesutului conjunctiv sînt şi mai puţin studiate ca cele prezentate, fără fundamentarea ştiinţifică a mecanismelor patogenice, nu vom mai insista asupra acestui subiect.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL IV-LEA

MODIFICĂRILE ORGANIZĂRII MACROMOLECULARE A ŢESUTULUI CONJUNCTIV DETERMINATE DE AGENŢI TERAPEUTICI

Acest capitol îşi propune să menţioneze două aspecte principale. În primul rînd, subliniem faptul că medicaţia administrată în scopul prevenirii sau tratării unui anumit focar lezional, acţionează asupra ţesutului conjunctiv din toate organele şi ţesuturile, modificînd ritmul de sinteză şi de catabolism al diferitelor macromolecule constitutive. Chiar dacă la nivelul focarului lezional respectiv, această acţiune poate fi mai bine evidenţiată şi este, aparent, mai intensă, nu trebuie uitat nici un moment că schimbăm, în acelaşi timp, paternul metabolic al tuturor celulelor ţesutului conjunctiv. Osteoporozele apărute în cursul tratamentului prelungit cu heparină, la bolnavi cu ateroscleroză, reprezintă doar unul din numeroasele exemple ce pot fi date în acest domeniu.

În al doilea rînd, dorim să subliniem faptul că medicaţia administrată în scopul prevenirii sau tratării unui anumit focar lezional, acţionează, mai mult sau mai puţin intens, şi asupra stabilităţii structurale a macromoleculelor din focarul respectiv. Rezultatul poate fi atît o diminuare a acestei stabilităţi, favorizînd procesele de degradare, cît şi o creştere, favorizînd procesele de acumulare.

Cu aceste precizări preliminare, vom prezenta, în cele ce urmează modul în care hormonii, vitaminele, medicaţia anti-inflamatoare şi iradiaţiile acţionează asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv normal şi patologic.

HORMONI

Literatura de specialitate din cursul ultimului deceniu menţionează, tot mai frecvent, modificări cantitative în eliminarea urinară a hidroxiprolinei, apărînd în cele mai variate boli endocrine. Menţionăm spre exemplificare : acromegalia, sindromul Cushing, hipertiroidia, hiperparatiroidia, feocromocitomul, aldosteronismul şi diabetul. De un interes deosebit sînt constatările, că, la pacienţii cu valori normale ale hidroxiprolinei urinare, apar creşteri importante în eliminarea acestui aminoacid, particular colagenului, după tratamente cu hormoni tiroidieni sau paratiroidieni [102, 292, 531]; 273

dimpotrivă, s-au notat reduceri importante ale eliminării, ca urmare a administrării de estrogeni [559].

Cantităţile de hidroxiprolină, anormal crescute în urină, reprezintă un test de catabolizare rapidă, fie a fracţiei neutrosolubile a colagenului, neprecipitată încă sub formă de fibrile, fie a fracţiilor insolubile din fibre. Predominanţa fiecăreia dintre aceste tipuri de acţiuni catabolice, pare a fi legată de particularităţile mecanismului de degradare, pus în mişcare de hormonul respectiv. Trebuie, în plus, luată în considerare capacitatea produşilor de secreţie endocrină de a regla „reutilizarea" colagenului, proprietate extrem de puţin cunoscută pînă acum. Este vorba de influienţa exercitată de hormoni în sensul eliberării colagenului din oase, cartilaj şi piele, precum şi din alte organe depozit sau bogate în această scleroproteină, eliberare sub formă de molecule dializabile. Aceste molecule sînt transportate în circulaţia generală spre regiuni unde posibilităţile locale de sinteză par insuficiente pentru o fibrilogeneză intensă. Existenţa „reutilizării" colagenului sub efectul hormonilor a fost demonstrată prin administrare de glicină şi prolină marcată şi, apoi, cercetarea radioizotopilor la nivelul unei plăgi. Dacă se lasă un lung interval de timp între introducerea radioizotopilor şi efectuarea plăgii, se poate constata cum aminoacizii marcaţi sînt, mai întîi, depozitaţi în oase, cartilaj şi piele, apoi, transportaţi spre zona de fibrilogeneză a plăgii [576].

Hormonii acţionează asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv atît prin mecanisme comune, cît şi prin mecanisme particulare. Mecanismele comune se exercită, în mod principal, asupra celulelor ţesutului conjunctiv, indiferent dacă este vorba de un element mezenchimal nediferenţiat sau pluripotent, fibroblast sau fibrocit, condroblast sau condrocit, osteoblast, osteocit sau osteoclast, element de tip mastocitar, celulă musculară netedă. Reamintim că aceste celule sintetizează nu numai colagenul şi elastina, ci şi glicoproteinele şi proteinele necolagene care intră în constituţia fibrelor reticulinice şi a membranelor bazale, precum şi glicoproteinele şi mucopolizaharidele acide ce formează substanţa fundamentală şi matricea cartilajului şi a osului. În plus, aceleaşi celule sintetizează şi enzimele necesare, atît propriului metabolism, cît şi sintezei şi degradării macromoleculelor constitutive ale ţesutului conjunctiv. Drept urmare, un hormon poate favoriza formarea fibrelor colagene atît prin activarea sintezei, cît şi prin inhibarea factorilor de degradare, respectiv a fermenţilor cu acţiune colagenolitică, prezenţi în lizozomii aceloraşi celule care elaborează şi macromoleculele de colagen. În plus, hormonul poate influienţa formarea fibrelor şi prin anumite variaţii cantitative ale substanţei fundamentale în care precipită colagenul. Invers, un hormon poate diminua formarea fibrelor de colagen, atît prin reducerea sintezei şi, deci, a posibilităţilor de reînnoire a materialului degradat în mod fiziologic, cît şi prin activarea enzimelor lizozomiale, cu acţiune colagenolitică. Acelaşi mecanism complex trebuie luat în considerare şi în problema modelării hormonale a substanţei fundamentale. Acest proces pare să fie rezultatul atît al stimulării sau inhibării producerii de acid hialuronic şi de condroitin-sulfaţi, cît şi al stimulării sau inhibării producerii de enzime

Scanned with OKEN Scanner

cu efect hialuronidazic, concentrate în lizozomii celulelor care au sintetizat mucopolizaharidele. Nu trebuie omis nici efectul pe care hormonii îl exercită asupra mecanismelor liberatoare de energie, solicitată atît de procesele de sinteză a macromoleculelor constitutive ale ţesutului conjunctiv, cît şi de procesele de sinteză a enzimelor implicate în metabolismul lor.

O discuţie privind modul în care hormonii acţionează asupra celulelor depăşeşte subiectul expunerii noastre. De aceea, vom prezenta numai datele mai importante şi mai adecvate înţelegerii modului în care hormonii pot modela ţesutul conjunctiv.

Anumite rezultate conturează ipoteza conform căreia celula are „codificat" răspunsul ei faţă de acţiunea unui anumit hormon iar secreţia endocrină nu constituie decît impulsul care pune în mişcare acest mecanism complex. Administrînd un anumit hormon, noi stimulăm punerea în mişcare a unor celule susceptibile la acţiunea hormonală şi care exercită un program tip, incluzînd variate procese metabolice [1216]. Susceptibilitatea pare să fie legată de existenţa unor gene care răspund la acţiunea hormonală, făcînd astfel, ca celula să devină o „ţintă" pentru hormon, avînd capacitatea de a-l accepta, absorbi şi concentra în organitele ei. Un exemplu demonstrativ în acest domeniu este celula conjunctivă din endometru, care conţine fracţii macromoleculare asociate cu estradiolul [1057]. Alte observaţii similare au fundamentat ideea că organele „ţintă" au capacitatea de a concentra, în nucleii celulelor respective, anumiţi hormoni circulanţi rezultînd o stimulare hormonală care se reflectă, în primul rînd, prin creşterea sintezei de proteine, controlată de gena susceptibilă la hormonul acumulat în celulă [1060]. Influenţînd gena şi mecanismul intracitoplasmatic de sinteză a proteinelor [741], apare, cu suficientă claritate, numărul extrem de mare de etape metabolice ce pot fi dereglate prin excesul sau insuficienţa stimulului hormonal, începînd cu procesul de reduplicare, trecînd prin cele de transcripţie, translaţie şi cataliză enzimatică şi sfîrşind cu organizarea fibrilară extracelulară a macromoleculelor.

Alături de aceste etape majore ale activităţii celulare, care pot fi influenţate prin acţiunea hormonilor, un interes deosebit trebuie acordat şi influienţelor exercitate de secreţiile endocrine asupra membranelor de la nivelul: mitocondriilor, reticulului endoplasmic, veziculelor aparatului Golgi, lizozomilor, variatelor structuri citoplasmatice cu aspect vacuolar, nucleolului, nucleului etc. S-a constatat că unele dintre aceste membrane prezintă, sub influenţe hormonale nefiziologice, modificări în diametrul porilor funcţionali sau anatomici, ale ionilor, ale grupelor reactive, ale enzimelor conexate. Aceste modificări duc la alterarea proceselor de difuziune, transport şi pinocitoză, influenţînd astfel în mod negativ sinteza şi eliminările extracelulare ale macromoleculelor sintetizate.

Hormonul epifizar

Nu s-au făcut pînă acum studii sistematice privind acţiunea hormonului epifizar asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv. Observaţia că pinealectomia determină o scădere a permeabilităţii

substanţei fundamentale, fără să apară şi variaţii cantitative ale hexozaminelor, ci doar reducerea gradului de polimerizare a acidului hialuronic [704], deschide perspective interesante de investigaţie în acest domeniu.

Hormonul somatotrop

Datele publicate pînă acum indică hormonul somatotrop ca un factor important de control al proceselor de fibrilogeneză, condrogeneză şi osteogeneză, al metabolismului seromucoidului, calciului şi fosforului, precum şi al proceselor de încorporare a radicalilor sulfat. Acest hormon apare, astfel, ca unul dintre principalii factori de modelare fiziologică a ţesutului conjunctiv, intervenind activ în procesele de creştere, de cicatrizare a plăgilor, de consolidare a fracturilor, de modelare la presiune a cartilajelor articulare, de adaptare la tracţiune a tendoanelor. De aceea, trebuie luată în consideraţie acţiunea hormonului somatotrop, în studiul tuturor proceselor de reparaţie, rezistenţă la uzură şi la tracţiuni mecanice. Tot atît de larg trebuie luată în considerare şi valoarea terapeutică a acestui hormon.

Dintre toate tipurile de macromolecule, care intră în constituţia ţesutului conjunctiv, cea mai net modificată din punctul de vedere al metabolismului, pare a fi colagenul. Această afirmaţie este susţinută atît de aspectul clinic al cazurilor de acromegalie, cît şi de valorile modificate ale hidroxiprolinei urinare, întîlnite la aceşti bolnavi[102]. În acelaşi sens, pledează şi creşterile considerabile ale hidroxiprolinei urinare, obţinute experimental, după administrare de hormon exogen, precum şi eliminările anormale de hidroxiprolină, evidenţiate la numeroase cazuri de nanism hipofizar [803].

Pentru exemplificare, menţionăm, că, la normali, media eliminării hidroxiprolinei în 24 de ore a fost de 33,8 mg, iar la un lot cu deficienţă în secreţia hormonului, media a scăzut pînă la 5,6 mg. La un copil de 8 ani cu nanism hipofizar, care elimina 14,1 mg de hidroxiprolină pe zi înainte de tratament, s-a constatat, după 28 de zile de administrare a 2,5 mg de hormon somatotrop pe zi, o creştere pînă la 63,5 mg; la 24 de zile după întreruperea tratamentului, valorile au scăzut din nou la 18,6 mg [530]. La pacienţi în vîrstă între 15 şi 22 de ani, administrarea hormonului somatotrop a determinat creşteri ale hidroxiprolinei urinare de la 42 mg, la 72 mg [291]. Asemenea creşteri s-au evidenţiat şi la acromegali, la care valorile hidroxiprolinei urinare depăşesc de aproximativ 3 ori normalul. Într-un astfel de caz, după iradiaţii, cantitatea de hidroxiprolină a scăzut de la 101,5 mg, la 58,3 mg [530].

Numeroasele date, în acest domeniu, din literatura de specialitate, sugerează existenţa unei interrelaţii între ritmul dezvoltării organismului şi cantitatea de hidroxiprolină eliminată prin urină, cantitate ce reflectă „pool"-ul de colagen, activ din punct de vedere metabolic. Această afirmaţie este susţinută de : *a*) excreţia mai mare de hidroxiprolină la copil, în comparaţie cu adultul; *b*) valorile mai reduse constatate la copiii care nu se dezvoltă normal, în comparaţie cu cei care au o dezvoltare adecvată vîrstei; *c*) creşterea eliminării urinare a hidroxiprolinei, după administrare de

hormon somatotrop ; *d*) constanţa cu care se găsesc valori anormal mărite la acromegali şi constanţa cu care aceste valori se reduc după radioterapia hipofizei. Un alt fapt de observaţie este paralelismul dintre creşterea eliminării în urină a hidroxiprolinei şi începutul creşterii somatice, ambele ca rezultat al administrării hormonului somatotrop. Cînd, consecutiv tratamentului de substituţie, nu a apărut mărirea valorilor urinare, nu au fost constatate nici ameliorări clinice. S-a sugerat, astfel, că testul cel mai fidel al unei terapeutici eficiente, îl constituie reflectarea urinară a catabolizării colagenului, respectiv valorile crescute ale hidroxiprolinei. Absenţa acestui test indică o doză sau o durată ineficientă a tratamentului hormonal [803].

Modul în care hormonul somatotrop influenţează metabolismul colagenului constituie un subiect de continuă preocupare. La şobolanii hipofizectomizaţi, timpul de înjumătăţire a fost de numai 38,0 $\pm$ 1,4 minute în a 552-a zi de viaţă, iar la animale intacte, de aceeaşi vîrstă, de 77,3 $\pm$ 3,5 minute, sugerînd că absenţa hormonului somatotrop ar fi urmată de o scădere, la aproape jumătate, a timpului necesar degradării macromoleculei de colagen [813]. În acelaşi sens, pledează şi datele obţinute din înregistrarea radioactivităţii pielii de maimuţă după marcarea macromoleculelor de colagen, fiind notate 225 de impulsuri pe minut şi pe 5 g de proteine la lotul martor, 107 impulsuri la lotul hipofizectomizat şi 265 de impulsuri, la lotul hipofizectomizat şi tratat cu hormon somatotrop [206].

O altă observaţie importantă, rezultată din studiul modificărilor care apar în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv, consecutiv hipofizectomiei, este diminuarea considerabilă a încorporării radiosulfatului în cartilaj, piele şi alte organe unde se sintetizează mucopolizaharide acide sulfatate [302]. În cartilajul costal, de exemplu, s-a notat că se reţine doar aproximativ 11% din cantitatea încorporată la animalul intact. Dacă însă s-a administrat, timp de 3 zile, cîte 25 γ de hormon somatotrop în fiecare zi, radiosulfatul se concentra în cartilaj în cantitate similară cu cea constatată la lotul martor, iar, în unele cazuri, valorile normale erau depăşite de 2—3 ori. Această acţiune nu pare să fie specifică, fiind constatată şi după administrarea de tiroxină. În afara capacităţii de sulfatare, hormonul somatotrop influienţează ritmul sintezei şi catabolizării variatelor tipuri de mucopolizaharide. Astfel, în pielea animalului hipofizectomizat, timpul de înjumătăţire a acidului hialuronic a crescut, de la normalul de 2,9 zile, la 5,1 zile, iar cel al condroitin-sulfaţilor, de la normalul de 4,8 zile, la 11,7 zile [955]. După tratarea şobolanilor cu hormon somatotrop s-a normalizat numai turnoverul condroitin-sulfaţilor, ceea ce a determinat o alterare a raportului acid hialuronic/condroitin-sulfaţi, care a persistat în tot cursul tratamentului.

În încheiere, menţionăm că se acceptă, astăzi, ca demonstrată, existenţa în macromolecula hormonului a unui „factor de sulfatare" [930]. Ipoteza prezenţei acestui factor a fost sugerată de observaţia, că, serul de şobolan normal a fost capabil să stimuleze încorporarea de radiosulfat în mucopolizaharidele animalului hipofizectomizat. Acest factor pare să fie constituit dintr-o macromoleculă termostabilă ce potenţează, în special,

Scanned with OKEN Scanner

pătrunderea de S_{35} în condrocite. Acţiunea *in vitro* este şi mai netă, dacă în mediul de incubaţie se adaugă serină, rezultînd elaborarea unor cantităţi maxime de complexe mucoproteice, necesare matricei cartilajului. Secundar, ar potenţa şi formarea macromoleculelor de colagen, grăbind hidroxilarea prolinei în hidroxiprolină [589]. Problema dacă hormonul somatotrop este un precursor sau un simplu stimulator al factorului de sulfatare, nu şi-a găsit încă un răspuns. Faptul că la animalele hipofizectomizate activarea factorului de sulfatare apare imediat ce se administrează hormonul somatotrop, a sugerat ideea că este „indusă" de acest hormon. Prin intermediul lui se controlează şi potenţează procesele de încorporare a grupărilor sulfat în mucopolizaharide şi glicoproteine, precum şi procesele de sulfoconjugare. S-a sugerat ca activitatea biologică a „factorului de sulfatare" să fie utilizată drept un test indirect de activitate a hormonului somatotrop, sperîndu-se să se poată evidenţia, prin acest test, anumite tulburării subclinice de mare importanţă în procesele de creştere ca şi în cele de reparare [15].

Hormonul tireotrop

Metodele chimice au permis separarea a două fracţii, prima caracterizată prin capacitatea de a stimula tiroida, a doua prin capacitatea de a stimula ţesutul conjunctiv [166], [1065]. Datele pe care le vom prezenta vor fi axate pe aceasta din urmă, cunoscută sub denumirea de *mesenchymotropic principle*. Se susţine că factorul mezenchimotrop al hormonului tireotrop hipofizar ar conţine mai mulţi subfactori, care produc stimularea sintezei de mucopolizaharide, mobilizarea lipidelor din depozite şi exoftalmia [34]. Datorită existenţei acestor subfactori, administrarea de hormon tireotrop, la animale tiroidectomizate, determină o creştere a sintezei de mucopolizaharide acide cu acumularea lor în interstiţii, o trecere în circulaţie a lipidelor din depozite şi, însfîrşit, un anumit grad de protruzie bulbară. Aceste efecte mezenchimotrope sînt inhibate de tiroxină şi, de aceea, la animalul netiroidectomizat, modificările produse de modelarea prin hormon tireotrop a ţesutului conjunctiv apar doar în primele zile de administrare.

Pentru clinică este important efectul hormonului tireotrop de a potenţa sinteza şi acumularea de acid hialuronic în zona retrooculară, înlocuind lipidele mobilizate din depozitele locale. Capacitatea hidrofilă a acestui mucopolizaharid favorizează apariţia exoftalmiei şi, pe un plan mai general, a alterărilor întîlnite în mixedem[34]. Mecanismul endocrin al exoftalmiei nu poate fi însă limitat doar la acţiunea hormonului tireotrop hipofizar, numeroase date experimentale sugerînd şi participarea altor hormoni.

De asemenea, ca factor aditiv trebuie luată în considerare şi acţiunea unor stimulatori tiroidieni *long-acting* (LATS), a căror importanţă este, încă, în curs de precizare. Fără să ignorăm factorii adiţionali,

Scanned with OKEN Scanner

hormonul tireotrop hipofizar rămîne considerat, în continuare, principalul agent al exoftalmiei, numeroase date experimentale pledînd pentru această afirmaţie.

La iepure, administrarea lui a determinat, în ţesutul retrobulbar, o creştere a acidului hialuronic, de la 0,33 ± 0,013 mg/100 mg la 0,89 ± 0,0097 mg şi a mucopolizaharidelor totale, de la 1,12 ± 0,009 la 1,97 ± 0,11 [541]; creşterea nu a mai fost constatată sub acţiunea altor hormoni sau fracţii hormonale.

La nivelul pielii, acumulările de acid hialuronic sînt, de asemenea, foarte nete, determinînd o scădere a permeabilităţii locale, ce dispare după tratamentul cu hialuronidază. Acumulări de acid hialuronic au loc în marea majoritate a orgánelor şi ţesuturilor, apărînd, de exemplu, ovare polichistice, cu un conţinut bogat în acest mucopolizaharid, la aproximativ 50 % dintre animalele tiroidectomizate şi tratate cu hormon tireotrop [1214]. Este impresionantă, de asemenea, acumularea de mucopolizaharide în muşchii extraoculari şi în sarcolema unor muşchi scheletici [35,36]. Principiul exoftalmotropic potenţează, în plus, încorporarea de sulf radioactiv în glandele lacrimale. De altfel, s-a şi propus utilizarea capacităţii glandelor Harder de a încorpora sulf radioactiv, ca test de activitate a principiului oftalmotropic al hormonului tireotrop hipofizar [1169]. Un alt aspect interesant îl constituie modificările în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv din tiroidă şi a coloidului intrafolicular, apărute sub influenţa administrării de hormon tireotrop. Menţionăm creşteri locale de acid sialic, ce însoţesc procesul de rezorbţie a coloidului [1192].

Complexitatea acţiunii hormonului asupra metabolismului mucopolizaharidelor ţesutului conjuctiv, considerată de mulţi cercetători a fi inversă celei exercitate de glucocorticosteroizi, va apare mai clar conturată în prezentarea pe care o vom face privind efectele tiroxinei. Capacitatea hormonului tireotrop hipofizar de a modela ţesutul conjunctiv prin influenţele exercitate asupra metabolismului colagenului şi elastinei, oferă un cîmp de studiu, practic neabordat.

Hormonul corticotrop

Se acceptă, în general, că efectele modelatoare asupra ţesutului conjunctiv ale ACTH-ului sînt, mai mult sau mai puţin, similare cu cele ale glucocorticoizilor şi, de aceea, nu le vom dezvolta în mod particular. Menţionăm totuşi, din numeroasele observaţii publicate în acest domeniu, două rezultate care ne-au atras în mod deosebit atenţia. Primul, se referă la capacitatea ACTH-ului de a „îmbătrîni" ţesutul conjunctiv asupra căruia acţionează. Este vorba de o acţiune care determină creşterea raportului prolină/hidroxiprolină în fracţia insolubilă a colagenului, considerată de anumiţi cercetători ca un indiciu de senescenţă, întrucît ar reflecta o diminuare a capacităţii fiziologice de sinteză a acestei macromolecule; conco-

Scanned with OKEN Scanner

mitent, se reduce şi *pool*-ul de colagen solubil, care rezultă din acumularea materialului sintetizat şi, astfel, degradarea nu mai este compensată de o neoformare corespunzătoare a fibrelor [146]. Reamintim că acest mecanism dereglat a fost pus la baza apariţiei osteoporozelor senile, a dispariţiei colagenului din dermul senil şi a multor altor procese care se însoţesc de „fuga" colagenului din depozitele fiziologice. Al doilea rezultat se referă la capacitatea ACTH-ului de a produce, la animalul suprarenalectomizat, apariţia de complexe macromoleculare anormale, în membranele bazale ale glomerulilor renali şi în mezangiul glomerular. Ele ar rezulta din conecatarea unor glicoproteine circulante, pe structurile preexistente colagenoglicoprotidice. La microscopul electronic, acest proces a fost urmărit în etape succesive de dezvoltare, putînd evolua pînă la formarea unei fibroze glomerulare difuze. Se susţine că nici factori imunologici, nici reacţii inflamatoare nu s-ar suprapune acţiunii ACTH-ului în producerea acestui tip de alterare [1148]. Prezenţa suprarenalelor ar favoriza o evoluţie mai rapidă şi mai gravă a leziunilor. O observaţie care merită, de asemenea, să fie menţionată, este constatarea că ACTH-ul produce, la animalele supuse la dietă aterogenă, o creştere a cantităţii de colagen din aortă, apărînd, în acelaşi timp în mod cu totul particular, o fracţie solubilă în NaCl 10% şi care nu conţine hidroxiprolină, ci doar prolină, ca orice tip de proteină necolagenă [453].

Hormonii gonadotropi

Despre capacitatea acestor produşi de secreţie endocrină de a modela organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv, vom prezenta anumite date în cadrul descrierii acţiunii hormonilor ovarieni şi testiculari.

Tiroxina

Efectul modelator cel mai net apare la nivelul cartilajului de creştere, unde, ca şi estrogenii, tiroxina grăbeşte maturarea, prin apariţia mineralizării sub forma a numeroase centre de osificare; procesul este inhibat de tiroidectomie [997, 1051]. În afara mineralizării precoce, se mai constată, în zona cartilajului de creştere, un proces de invazie vasculară prin neoformare de capilare sanguine. Dacă se continuă administrarea de tiroxină pe un interval mai lung de timp, osificarea este urmată de decalcifiere zonală, apărînd insule de hiperosificare, ce alternează cu zone în care matricea osoasă a dispărut. Este vorba de un proces mai complex de modelare a osului, în care intervine, probabil, şi paratiroida, stimulată de fosforul mobilizat [82]. El se reflectă şi prin creşterea eliminării urinare a hidroxiprolinei, notîndu-se, în cazuri de tireotoxicoză, salturi de la normalul de 42,5 mg pe zi, la 261 mg pe zi [102]. Nu poate fi, încă, precizată particularitatea mecanismului de acţiune prin intermediul căruia tiroxina mode-

Scanned with OKEN Scanner

lează ţesutul osos. În culturi de ţesuturi de osteoblaşti, ea inhibă încorporarea de glicină marcată în macromolecula de colagen, ceea ce ar putea sugera o blocare a sintezei colagenului [1086]. În aceste condiţii, creşterea valorilor hidroxiprolinei urinare ar reflecta un catabolism anormal al colagenului preexistent în matricea osoasă. Cercetîndu-se efectul L-triiodotironinei asupra modificărilor ce apar în derm sub acţiunea razelor X (840 r/minut), după iradiaţie s-a evidenţiat o creştere importantă a hidroxiprolinei locale, de la 22,5 mg în ziua iradiaţiei, la 31,8 mg după 42 de săptămîni. Dacă se administrează hormon tiroidian, creşterea nu mai apare şi, în plus, scad valorile hidroxiprolinei şi în zonele de piele neiradiată. Cu cît tratamentul este instituit mai rapid după iradiaţii, cu atît efectul inhibant al hormonului tiroidian asupra sintezei colagenului pare mai evident. Dacă hormonul este administrat înainte de iradiaţie, efectele razelor X nu se mai traduc prin modificarea cantităţii de hidroxiprolină [574].

Tiroxina acţionează atît asupra mucopolizaharidelor acide din ser, cît şi din ţesuturi. În ser, administrarea de tiroxină duce la o scădere a valorilor acestor substanţe, în timp ce tiouracilul restabileşte aceste valori, sau le ridică peste normal [632]. În ţesuturi, tiroxina reduce sinteza de acid hialuronic, precum şi gradul său de polimerizare, rezultînd o creştere a permeabilităţii interstiţiale şi, respectiv, o difuzare mai rapidă a substanţelor prin ţesutul conjunctiv. Reducerea cantitativă a mucopolizaharidelor este reflectată de diminuarea valorilor hexozaminei, constatată nu numai în piele, ci şi în ţesutul retrobulbar, în corpul vitros şi în lichidele intraarticulare [630]. În peretele aortei, administrarea de tiroxină duce, de asemenea, la o scădere semnificativă a acidului hialuronic (de la $0{,}15 \pm 0{,}017$ mg/100 mg, la $0{,}076 \pm 0{,}010$), în timp ce, tratamentul blocant adecvat ridică aceste valori la cifre ce depăşesc cu mult valoarea iniţială (de ex., de la $0{,}15 \pm 0{,}017$ mg/100 mg, la $0{,}566 \pm 0{,}012$) [542]. Scad, de asemenea, mai puţin semnificativ, condroitin-sulfaţii A, B şi C; în schimb, ei cresc după blocarea activităţii hormonale. Drept urmare, mucopolizaharidele totale au fost găsite, în aorta de iepuri normali în cantitate de $0{,}714 \pm 0{,}008$ mg/100 mg, la cei trataţi cu tiroxină în cantitate de $0{,}405 \pm 0{,}09$, iar la cei cărora li s-au administrat blocante ale secreţiei tiroidei, valorile au crescut la $1{,}555 \pm 0{,}011$ [542]. La nivelul cartilajului, tiroxina potenţează atît sinteza, cît şi degradarea condromucoproteinei, predominînd adesea degradarea, cu formare de zone de condroliză. Administrarea de tiouracil readuce mucopolizaharidele din matricea cartilajului la valori normale [639]. Aceste observaţii, raportate pe plan mai larg, pot ajuta la explicarea apariţiei nanismului hipotiroidienilor. La nivelul plăgilor, se menţionează o diminuare a încorporării de sulfat radioactiv, asociată cu o vindecare mai anevoioasă a ţesutului respectiv [753]. În comparaţie cu efectele hormonilor somatotrop şi tireotrop asupra plăgilor cu ţesut de granulaţie, după administrarea de tiroxină, se constată o dezvoltare mult mai redusă a diferitelor tipuri de fibre, cît şi a substanţei fundamentale. De asemenea, este mult diminuată intensitatea reacţiei inflamatoare [166].

Scanned with OKEN Scanner

Considerăm util să menţionăm observaţiile care sugerează că tiroxina potenţează alterările produse de epinefrină asupra ţesutului conjunctiv, ea însăşi putînd determina alterări similare, mai ales la nivelul aortei [668]. În astfel de condiţii, acumulările de mucopolizaharide, de colagen şi de glicoproteine fac parte din reacţiile de reparaţie tisulară. Tiroidectomia ar preveni leziunile produse de adrenalină, pe cînd hormonul tireotrop hipofizar nu pare să posede această capacitate protectoare [668].

O problemă particulară, legată de acţiunea tiroxinei asupra ţesutului conjunctiv, o constituie vindecarea anevoioasă a plăgilor şi ulceraţiilor. Experimental s-a observat că hormonul tiroidian diminuă considerabil capacitatea de retracţie a plăgilor [753], fără să se poată preciza dacă este vorba de un fenomen celular sau fibrilar. Pe de altă parte, s-a constatat, că, sub influenţa unor cantităţi nefiziologice de tiroxină, fibroblaştii nu mai formează acele agregate poliribozomiale, necesare tiparului unei macromolecule de colagen, alcătuită din trei lanţuri polipetidice spiralate[689]. Nu s-ar mai produce, în cantităţi normale, nici hidroxilarea prolinei, rezultînd o scleroproteină cu o stabilitate structurală mult diminuată, care dă naştere la fibrile cu un grad redus de rezistenţă mecanică. În anumite condiţii experimentale, s-a notat o diminuare pînă la 50% a sintezei hidroxiprolinei, datorată acţiunii directe a tiroxinei asupra fibroblaştilor [688]. În acest proces alterativ este implicată şi modificarea structurală a acidului ribonucleic mesager, fapt care ar putea explica incapacitatea ribozomilor de a agrega în complexele necesitate de formarea macromoleculei de colagen. De remarcat că aspecte similare au fost notate şi la animalele carenţate în vitamina C.

În lumina datelor prezentate, apariţia unor valori crescute ale hidroxiprolinei urinare la hipertirodieni, poate fi explicată atît prin creşterea ritmului de sinteză, cît şi al aceluia de degradare, cu predominenţa catabolismului. Dacă se blochează secreţia tiroidei în cursul dezvoltării unei plăgi, sinteza de colagen şi de mucopolizaharide va diminua, ca şi reactivitatea ţesutului conjunctiv local la variaţi stimuli. Ulterior însă, intervenţia hormonului tireotrop hipofizar, a sistemului nervos vegetativ local şi a hormonilor corticosuprarenali, normalizează dinamica procesului de reparaţie. Totuşi, trebuie să ţinem seamă în permanenţă că modul cum funcţionează tiroida poate influenţa atît vindecarea plăgilor, cît şi dezvoltarea fibrozelor difuze din stadiile terminale a numeroase procese patologice. Din acest punct de vedere, incidenţa mare a aterosclerozei la hipotiroidieni constituie un argument de o incontestabilă valoare clinică, notîndu-se corelaţii statistic semnificative, între frecvenţa guşei şi a aterosclerozei [1082]. Experimental, extractul de tiroidă ar avea efecte antiaterogene, acţiunea sa antilipemică exercitîndu-se cu predilecţie la nivelul arterelor mari, fiind nulă în alte organe, cum ar fi, de exemplu, ficatul [779].

Un ultim subiect, legat de modelarea ţesutului conjunctiv prin intermediul tiroidei, îl constituie aşa-zisele osteoporoze şi osteofibroze întîlnite în tireotoxicoze, sau provocate prin administrarea inadecvată a hormonului tiroidian. Eliminarea crescută a calciului prin urină la hipertiroidieni a fost menţionată cu trei decenii în urmă [40]. Părerile au fost

Scanned with OKEN Scanner

împărţite, dacă acest test indică o sinteză crescută, sau un catabolism crescut la nivelul ţesutului osos. Investigaţii cu ajutorul radioizotopilor au demonstrat că tiroxina potenţează ambele procese [592]. Aşa s-ar explica şi capacitatea hormonului de a grăbi vindecarea fracturilor experimentale, constatîndu-se, de exemplu, o maturare a calusului, după 20 de zile de la fractură sub acţiunea dozelor fiziologice de hormoni tiroidieni, şi după 50 de zile, dacă s-a efectuat ablaţia glandei o dată cu fractura [1059]. În ceea ce priveşte efectul tirocalcitoninei, s-a constatat, că, la şobolanul mascul, produce o excreţie redusă de peptide conţinînd hidroxiprolină, probabil ca urmare a inhibării catabolismului la nivelul matricei osoase [708]. Acţiunea ei nu este încă lămurită şi se sugerează că ar fi foarte complexă. Astfel, dacă se perfuzează şobolanul cu hormon paratiroidian timp de 6—18 ore pînă la apariţia unor eliminări urinare crescute de hidroxiprolină, calciu şi fosfor, toate aceste efecte dispar dacă se administrează concomitent tirocalcitonină. În doze de 50 mg pe oră, ea a diminuat cu 88% eliminarea hidroxiprolinei şi cu 77,9 mg pe oră, a calciului [585]. Ne aflăm, deci, în prezenţa, nu numai a unei acţiuni directe de inhibare a catabolismului osului, ci şi de blocare a efectelor exercitate de hormonul paratiroidian. Cercetările în acest domeniu vor aduce şi alte date importante, care vor creia un cadru mai larg de înţelegere a modului cum influenţează tiroida metabolismul ţesutului osos.

Sînt foarte puţine date în literatură privind rolul tiroxinei în procesul de „îmbătrînire" a ţesutului conjunctiv. O observaţie ce merită să fie reţinută este existenţa probabilă a unui paralelism între procesul de creştere a unui organ, stimulat de tiroxină, şi procesul de maturare a colagenului din organul respectiv [380].

Efectele tiroidectomiei reflectă, în mare măsură, importanţa rolului jucat de hormonii elaboraţi de tiroidă în modelarea ţesutului conjunctiv. Manifestarea clinică dominantă este dezvoltarea progresivă a unui material mucinos ce invadează interstiţiile conjunctivo-vasculare, alcătuit din cantităţi, nefiziologic crescute, de acid hialuronic şi de condroitin-sulfaţi [1168]. Această alterare în metabolismul mucopolizaharidelor acide apare ca o consecinţă directă a tiroidectomiei, fiind prezentă şi cînd nu există un exces de hormon tireotrop hipofizar în circulaţie. În acelaşi sens, pledează creşterile cantitative de mucopolizaharide, obţinute prin blocarea sintezei tiroxinei, precum şi normalizarea procesului după administrarea de hormon. În insuficienţele tiroidiene prelungite, potenţarea elaborării de acid hialuronic rămîne constantă, pe cînd cea a sintezei condroitin-sulfaţilor se reduce treptat. În plus, s-a notat şi o alterare a raportului condroitin-sulfat B/condroitin-sulfat A, sugerînd o modificare nefiziologică a raportului între diferitele tipuri de mucopolizaharide. Mecanismul acestor alterări este încă puţin cunoscut, anumite date indicînd, în privinţa acidului hialuronic, nu numai potenţarea sintezei, ci şi blocarea parţială a degradării [958]. În ceea ce priveşte condroitin-sulfaţii, reducerea lor progresivă ar rezulta din absenţa stimulării unei epimeraze ce catalizează sinteza condrozaminei [285]. Aceste efecte nu au un caracter general şi nu apar în toate organele şi ţesuturile cu aceeaşi intensitate. Astfel, de exemplu,

Scanned with OKEN Scanner

blocarea sintezei tiroxinei este urmată de creşterea încorporării de sulf radioactiv în piele, în timp ce, în cartilaj şi os, nu apare această modificare [590]. Dacă se produce o plagă în pielea şobolanului, mucopolizaharidele din plagă nu par să fie modificate cantitativ după tiroidectomie, pe cînd cele din pielea vecină cu plaga sînt intens modificate [754]. La nivelul plămînilor de cobai, am constatat, după tiroidectomie, o creştere, statistic semnificativă, a celulelor încărcate cu acid hialuronic, pe cînd, în aortă, acest proces nu a putut fi evidenţiat [1119]. Ar exista, deci, zone de receptivitate particulară ale ţesutului conjunctiv la absenţa tiroxinei şi zone mai puţin susceptibile la această absenţă. Dar, independent de aceste consideraţii, prezenţa de geluri hidrofile, bogate în acid hialuronic, poate constitui o bază morfologică pentru explicarea unei simptomatologii considerată pur funcţională, reflectată prin tulburări de ritm cardiac, dispnee de efort, constipaţie, alterări psihice, hipertensiune arterială, modificări în dinamica anumitor articulaţii şi chiar sterilitate. Acest gel hidrofil a fost evidenţiat, în jurul majorităţii capilarelor, la mixedematoşii netrataţi [780]. Tulburările funcţionale respective sînt amendate după tratamentul cu tiroxină, indiferent de organul sau ţesutul cu simptomatologia dominantă.

În ceea ce priveşte efectul tiroidectomiei asupra metabolismului colagenului, s-au notat modificări atît ale procesului de sinteză, cît şi de degradare [45]. În derm, de exemplu, se reduce pînă la 80% colagenul neutrosolubil, pînă la 64% cel acidosolubil şi pînă la 67% cel insolubil [350]. Mai menţionăm că în plăgile animalelor tiroidectomizate ar exista o cantitate mai mare de ţesut de granulaţie, o capsulă conjunctivă mai groasă şi fibre conjunctive mai numeroase şi mai dense, decît la martorii netiroidectomizaţi [1067].

Hormonul paratiroidian

În 1905 McCallum a demonstrat că extractele de paratiroidă, injectate la animalele de laborator, produc o demineralizare a ţesutului osos. Şi mai convingătoare, în acest sens, au fost lucrările care au evidenţiat procese de osteoliză: a) punînd în contact osul cu fragmente de paratiroidă [78]; b) grefînd subperiostal paratiroida [202]; c) adăugînd hormon paratiroidian la mediul de cultură al osteoblaştilor [364].

Dovada cea mai evidentă a catabolizării matricei osoase sub influenţa unor cantităţi crescute de hormon paratiroidian, o constituie mărirea valorilor urinare ale hidroxiprolinei. Întrucît aproximativ jumătate din colagenul existent în întregul organism este inclus în matricea oaselor, nu trebuie să pară surprinzător faptul, că, cele mai mari creşteri ale eliminării urinare a hidroxiprolinei au fost semnalate în boli distructive ale ţesutului osos sau după administrare de hormon paratiroidian [292], [575], [637]. În acelaşi sens pledează şi scăderile spectaculare ale eliminărilor de hidroxiprolină, după ablaţia adenoamelor de paratiroidă [102], [616].

Scanned with OKEN Scanner

Întrebarea, dacă, eliminarea crescută de hidroxiprolină la bolnavii cu hiperparatiroidism reflectă o degradare rapidă a unui colagen nou format, sau o dezagregare a fibrelor de colagen din matricele osoase preexistente, a primit un răspuns satisfăcător, pe baza studiilor cu radioizotopi. Aceste studii au demonstrat, că, nu apare o potenţare a sintezei, ci doar a catabolismului colagenului insolubil, mineralizat, rezultînd dispariţia suportului organic care susţinea cristalele de hidroxiapatită [42]. Mai mult decît atît, studii efectuate *in vitro*, în culturi de ţesuturi, au evidenţiat inhibarea sintezei colagenului sub acţiunea hormonului paratiroidian. Astfel, fragmentul de os netratat a elaborat 33×10^{-5} μ moli de hidroxiprolină pe 100 mg de os, iar cel tratat cu hormon paratiroidian, doar $5{,}4 \times 10^{-5}$ μ moli [536]. O altă dovadă concludentă, în sensul potenţării degradării colagenului preexistent în matricea osoasă la hiperparatiroidieni, o constituie observaţia că administrarea de prolină marcată cu C_{14}, sub tratament hormonal adecvat, nu permite evidenţierea radioizotopului în peptidele care conţin hidroxiprolină şi care cresc considerabil în urină. Hidroxiprolina eliminată provine deci din altă sursă decît colagenul neoformat, respectiv din degradarea matricei osoase, al cărei turnover extrem de lent nu a permis includerea prolinei marcate în macromoleculele fibrelor de colagen [463].

Acţiunea modelatoare directă a hormonului paratiroidian, asupra ţesutului osos, apare astfel bine documentată, susţinută dealtfel şi de aspectele microscopice, care permit să se constate multiplicarea condroblaştilor, absenţa invaziei capilare, rezorbţii lacunare şi o aparentă transformare a osteoblaştilor în osteoclaşti. S-a putut demonstra, în culturi de ţesuturi, că osteoblastul constituie celula „ţintă" a hormonului paratiroidian, care declanşează, în această celulă, o serie de modificări metabolice, reflectate prin procesul de degradare a matricei osoase, rezultînd creşterea hidroxiprolinei, hexozaminelor şi a calciului în mediul de cultură. O singură unitate de hormon pe ml de mediu de cultură s-a dovedit capabilă să solubilizeze 40—50% dintr-un os de embrion, în decurs de numai 3 zile [1085]. Mecanismul de acţiune a hormonului ar include, pe primul plan, potenţarea sintezei de adenilat-3′-5′-monofosfat sau AMP-ciclic. Această substanţă reproduce, în culturi de ţesuturi, efectele hormonului paratiroidian, provocînd o catabolizare rapidă şi masivă a osului. Procesul de rezorbţie se însoţeşte de eliberarea calciului, fosforului, hidroxiprolinei şi hexozaminelor în mediul de cultură, concomitent cu expulzarea din celule a enzimelor lizozomiale. Ulterior, echipamentul enzimatic al lizozmilor se reface sub influenţa AMP-ciclic, dar refacerea poate fi blocată, ca şi în cazul hormonului paratiroidian, prin administrare de actinomicină D sau puromicină. Aceste observaţii au sugerat ipoteza că hormonul ar acţiona asupra AMP-ciclic şi, prin intermediul lui, ar influenţa sinteza ARN mesager şi a proteinelor în general [1085].

Nu vom intra în amănuntele datelor de morfologie, mai ales că anumite probleme sînt încă departe de a fi precizate (ca, de exemplu, originea şi semnificaţia funcţională a osteoclaştilor, sau, dacă demineralizarea începe cu dizolvarea cristalelor sau cu dezagregarea suportului

Scanned with OKEN Scanner

organic fibrilar). Insistăm numai asupra orientării mai noi în acest domeniu, bazată pe mecanismul eliberării de enzime lizozomiale, cu efect colagenolitic. Experimental, capacitatea hormonului paratiroidian de a potența eliberarea extracelulară și activitatea acestor enzime devine evidentă de la administrarea a 10 unități de extract glandular pe gram de greutate corporală [1161]. Ca urmare a activării enzimelor difuzibile cu proprietăți colagenolitice, osteoblaștii de la animalele tratate cu hormon paratiroidian au fost capabile să digere un film de gelatină, în timp ce osteoblaștii de la lotul de animale netratate, nu au prezentat această capacitate [97]. Nu este vorba doar de un proces de eliminare selectivă a colagenazelor, ci a unui întreg complex enzimatic prezent în lizozomi, conținînd variate tipuri de hidrolaze acide, cu acțiune glico- și proteolitică. Experimental, hidrolazele acide, eliberate sub acțiunea hormonului paratiroidian, sînt active la un pH de 3,6 [1084]. S-a sugerat că toate aceste hidrolaze ar fi eliminate brusc, sub formă concentrată, spre a se obține un efect maxim de degradare a marginilor spațiilor lacunare din jurul fiecărei celulă. Procesul pare asemănător celui descris la nivelul cartilajului sub acțiunea vitaminei A, care, de asemenea, labilizează membranele lizozomiale, eliberînd hidrolaze acide și rezultînd procese de condroliză. Crearea locală a unui pH tisular de 3,6, adecvat activității enzimatice, se pare că s-ar realiza prin anumite modificări metabolice, determinate tot prin acțiunea directă a hormonului paratiroidian. Analize biochimice au demonstrat că, în osul pe cale de demineralizare, la subiecți cu hiperparatiroidism, se mărește de aproximativ 3 ori consumul de oxigen și, de aproximativ 2 ori, producția de lactat [333]. Creșterea cantității de acid lactic a putut fi obținută și experimental, prin administrare de hormon paratirodian. În plus, s-au evidențiat și cantități anormal crescute de acid citric, rezultate dintr-o blocare a ciclului Krebs în osteoblaști, datorată dispariției activității dehidrogenazei izocitrice [1160]. În același sens ar pleda și observația, că, la cîinele tratat cu hormon paratiroidian, se constată o mărire considerabilă a afluxului de citrat dinspre țesutul osos, spre circulația generală [326]. Efecte similare apar și în stările de hiperoxie, într-o atmosferă conținînd 95% oxigen. Acizii lactic și citric pot exercita efecte demineralizante locale și pot diminua pH-ul tisular, la nivelul necesitat de activitatea maximă a enzimelor lizozomiale. Se consideră, pe baza unor date experimentale, că, pentru fiecare anion de lactat eliberat de celulă, este excretat simultan un ion H^+, ceea ce ar duce la o mărire și mai accentuată a gradului de acidifiere a spațiilor din jurul osteoblaștilor, potențînd efectele de solubilizare a depozitelor minerale după următoarea reacție [1085]:

$$Ca_3(PO_4)_2 + {}_2H^+ \longrightarrow 3\,Ca^{++} + 2\,HPO_4^{--}, \text{ sau, în cazul hidroxiapatitei:}$$
$$Ca_{10}(PO_4)_6\,(OH)_2 + 8\,H^+ \longrightarrow 10\,Ca^{++} + 6HPO_4^{--} + 2H_2O.$$

Se pare că mărirea intracelulară a concentrației de calciu, ca rezultat al procesului de demineralizare a zonelor pericelulare, ar constitui mecanismul de inhibare a dehidrogenazei izocitrice, enzimă necesară oxidării citratului. Se întreține, astfel, o continuă alterare metabolică, ce duce la

Scanned with OKEN Scanner

acumularea unor cantităţi crescute de citrat, care menţin un pH coborît ce permite activitatea enzimelor lizozomiale.

Importanţa deosebită pentru clinică a modelării ţesutului osos de către hormonul paratiroidian a făcut ca investigaţiile privind modul de acţiune a acestui hormon să fie centrate, aproape exclusiv, asupra colagenului din matricea osoasă. De aceea, datele privind efectele hormonului asupra metabolismului mucopolizaharidelor sînt extrem de limitate. Menţionăm, de exemplu, că la nivelul pielii şi cartilajului s-a constatat o potenţare a sintezei mucopolizaharidelor acide sulfatate. În culturi de ţesut osos apar, de asemenea, procese de activare a sintezei mucopolizaharidelor. Astfel, osteoblaştii de la animalele netratate au elaborat $1{,}4 \times 10^{-3}$ μ moli de hexozamină pe 100 g os, iar cele tratate cu hormon paratiroidian, 2×10^{-3} μ moli de hexozamină; sinteza crescută nu a fost inhibată după adăugare de glucocorticoizi la mediul de cultură [536].

Datele prezentate indică complexitatea acţiunii hormonului paratiroidian, care influenţează sinteza colagenului şi a mucopolizaharidelor, potenţează eliminarea de enzime lizozomiale cu efecte glico- şi proteolitice şi modifică ciclul metabolic al osteoblaştilor, favorizînd acumulări de acizi lactic şi citric.

Insulina

Insulina poate modela ţesutul conjunctiv prin acţiunea sa anabolică generală, stimulînd procesele endergonice, potenţînd formarea de legături şi creşteri ale lanţului carbonic, activînd transportul de substanţe şi eliberarea de energie rapid utilizabilă. În plus, prin efectele sale particulare asupra metabolismului glucozei, ea poate influenţa biogeneza tuturor fracţiilor glucidice care intră în constituţia mucopolizaharidelor şi glicoproteinelor ţesutului conjunctiv. În acest sens este interpretată creşterea, statistic semnificativă a concentraţiei hexozaminelor în ţesuturi în cursul diabetului aloxanic, creştere suprimată după administrarea de insulină [1162].

Ca observaţii mai deosebite menţionăm scăderea încorporării de radioizotopi, atît în acidul hialuronic, cît şi în condroitin-sulfaţii din piele, la animalele cu diabet experimental [956]. Aceste modificări, sugerînd o diminuare a sintezei, dispar după administrarea hormonului. Pe de altă parte, în cartilaj, metabolismul mucopolizaharidelor nu a apărut alterat sub acţiunea insulinei, cel puţin după administrarea de doze apropiate de cele fiziologice [166].

Osteoporoza întîlnită la diabetici a ridicat problema unei acţiuni directe a insulinei asupra metabolismului colagenului, în general, şi al celui din oase, în special. Studii cu izotopi radioactivi au demonstrat că hormonul potenţează procesele de sinteză a colagenului [735]. Pe fragmentele de os cultivat *in vitro*, încorporarea glicinei marcate în macromolecula de colagen neoformat a apărut crescută, cu aproximativ 30% faţă de normal, după adăugarea insulinei la mediul de cultură [478]. În lumina

Scanned with OKEN Scanner

acestor date, procesele de osteoporoză întîlnite la diabetici au fost corelate cu scăderea ritmului fiziologic de reînnoire a matricei osoase, datorită pragului redus de acţiune a insulinei, prag insuficient spre a stimula formarea unor cantităţi adecvate de colagen.

Glucocorticoizii

Investigaţii de laborator au demonstrat că acţiunile exercitate de glucocorticoizi asupra ţesutului conjunctiv influenţează procesele de: *a*) sinteză; *b*) depozitare şi eliminare a materialului sintetizat; *c*) polimerizare extracelulară a macromoleculelor; d) modelare catabolică a fibrelor şi a substanţei fundamentale; *e*) conectarea intra- şi intermoleculară prin legături încrucişate; *f*) distribuţia apei şi electroliţilor în (şi între) structurile mezenchimale; *g*) mineralizare.

În linii mari, aceste acţiuni se datoresc, în primul rînd, capacităţii glucocorticoizilor de a inhiba atît oxidarea, cît şi fosforilarea, diminuînd posibilităţile energetice ale celulelor ţesutului conjunctiv, mai ales pe linia reacţiilor endergonice, necesare proceselor de sinteză. În condiţii patologice, apar alterate şi procesele endergonice implicate în reacţiile inflamatoare, cum ar fi difuziunea apei şi electroliţilor, hidrofilia tisulară, reactivitatea şi motilitatea celulelor etc. Efectele, atît de favorabile, obţinute după terapia cu glucocorticoizi asupra proceselor inflamatoare, nu trebuie să ne facă să pierdem din vedere că hormonii au acţionat în acest timp asupra tuturor componentelor ţesutului conjunctiv din organism. Chiar dacă testele de laborator nu indică procese de osteoporoză sau alt tip de alterare a structurilor mezenchimale, există, probabil, modificări subclinice asemănătoare celor constatate la nivelul pielii, unde s-a demonstrat, că, în 5 săptămîni de tratament cu prednison, se produc variaţii cantitative şi calitative ale colagenului şi mucopolizaharidelor, corespunzătoare unei perioade de 5 ani de „îmbătrînire fiziologică" [670].

Dintre toate elementele ţesutului conjunctiv, fibroblastul reprezintă celula asupra căreia s-a studiat cel mai adînc acţiunea cortizonului şi a hidrocortizonului. O primă constatare interesantă o constituie observaţia, că în doza fiziologică, hormonii determină modificări de formă şi de contur celular, cu apariţia, atît *in vivo*, cît şi *in vitro*, a elementelor de tip globular [286]. Această observaţie ridică grele probleme pentru microscopistul care doreşte să identifice natura elementelor din infiltratele cu aşa-zise „celule rotunde", atît de frecvent întîlnite în procese patologice de cele mai variate origini. Se pare că modificarea de formă şi contur a fibroblaştilor ar fi consecinţa acumulării hormonilor glucocorticoizi la periferia membranei celulare. Se mai constată, în plus, o reducere a pinocitozei şi a altor procese care duc, în condiţii fiziologice, la pătrunderea şi degradarea intracelulară a histaminei, serotoninei şi a unor polipeptide variate [115]. Un alt efect al contactului cu glucocorticoizii îl reprezintă încetarea activităţii de multiplicare a fibroblaştilor. Din acest punct de

vedere este important de menţionat constatarea că numai hormonii cu o grupare hidroxil la C_{11} posedă această proprietate inhibantă, pe cînd, cei cu o grupare cetonică la acelaşi carbon, nu inhibă proliferarea celulară [114]. Plecîndu-se de la aceste observaţii, s-a sugerat că fibroblastul, însuşi, ar putea să-şi regleze ritmul şi intensitatea proliferării, prin intermediul variaţiei de susceptibilitate la glucocorticoizii cu grupări fie hidroxil, fie cetonice la C_{11}. În afara acestor particularităţi de structură chimică, se insistă şi asupra importanţei dozei administrate, cortizonul, în cantităţi între 0,5—3,25 mg pe zi, activînd proliferarea fibroblaştilor, iar, în cantităţi ce depăşesc 5 mg pe zi, exercitînd efecte inhibante [175].

Pătrunşi în celula conjunctivă, glucocorticoizii par să acţioneze foarte variat asupra diferitelor organite. Pe primul plan se menţionează capacitatea hormonilor de a inhiba sinteza diferitelor tipuri de acizi ribonucleici, necesari tuturor fazelor proceselor de sinteză [735]. Ca o consecinţă a inhibării, dispare sau există în cantitate insuficientă acidul ribonucleic ribozomal, necesar cuplării a aproximativ 100 de ribozomi, spre a forma macheta structurală pe care va lua naştere macromolecula de colagen [363]. Astfel, s-a putut demonstra, că, la embrionii trataţi cu hidrocortizon, există cu 80—90% mai puţini poliribozomi în fibroblaşti, în comparaţie cu embrionii netrataţi [702]. S-a notat, de asemenea, diminuarea numărului de ribozomi ataşaţi pe membranele reticulului endoplasmic [545]. Anumite rezultate pledează şi pentru o interferenţă directă a hidrocortizonului cu acidul ribonucleic mesager [404]. În unele lucrări nu s-au obţinut date concludente privind capacitatea glucocorticoizilor de a bloca procesul de hidroxilare a prolinei în hidroxiprolină [702]; în alte lucrări, se insistă în mod deosebit asupra acestei blocări [208], argumentată şi de faptul că nu se pot evidenţia intermediari hidroxilaţi ai prolinei [259]. În sfîrşit, nu pare lipsită de interes nici observaţia că, în anumite doze şi condiţii experimentale, glucocorticoizii pot activa transformarea prolinei în hidroxiprolină, potenţînd astfel sinteza colagenului [735]. În sprijinul acestei observaţii, pledează şi anumite date biochimice, atestînd, la şobolan, creşterea cantităţii de colagen după administrarea de 5 mg de cortizon, această creştere apărînd, statistic semnificativă, în ficat, perete gastric şi humerus, şi nesemnificativă în piele [591]. Fără a intra în amănunte, legate de materialul şi metoda folosită de fiecare cercetător în parte, menţionăm că marea majoritate a autorilor sînt de acord în a susţine că hormonii glucocorticoizi exercită un efect inhibant asupra metabolismului tuturor tipurilor de macromolecule ce intră în constituţia ţesutului conjunctiv.

Anumite modele experimentale sînt extrem de convingătoare din acest punct de vedere. Astfel, cu 0,05 mg de hidrocortizon se obţine, la embrionul de pui de găină, o reducere cu aproximativ 50% a cantităţii de prolină marcată, inclusă în macromolecula de colagen, reflectînd o reducere la jumătate a sintezei [299]. Efectul inhibant apare la aproximativ trei ore de la administrarea hormonului, atinge un maximum, apoi dispare progresiv. În culturi de celule sinoviale, administrarea de 1,0 µg de hidrocortizon pe ml de mediu de cultură, a redus considerabil sinteza colagenului, cantitatea de hidroxiprolină scăzînd de la normalul de 0,519 µM/flacon, la 0,097 µM, iar cea de colagen total de la 0,560 la 0,094 [198].

Concomitent cu efectul de inhibare a sintezei colagenului, glucocorticoizii par să potenţeze activitatea colagenazei, mărind astfel ritmul de degradare a fibrelor. Aceste afirmaţii sînt bazate atît pe constatarea că injectarea de cortizon, hidrocortizon sau triamcinolon măreşte fracţia de colagen solubil din ţesuturi, cît şi pe observaţia că administrarea de glucocorticoizi împreună cu colagenază, determină o degradare mai mare a colagenului, decît injectarea izolată a enzimei [568].

De un interes deosebit ni se par lucrările în care s-au încercat corelări morfologice şi biochimice ale modificărilor în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv, apărute după administrarea de glucocorticoizi. La nivelul pielii, de exemplu, aceşti hormoni produc alterări ce apar la microscopul fotonic sub aspectul atrofierii fibrelor fucsinofile, subţierii şi fragmentării fibrelor elastice şi reticulinice, dispariţiei substanţei fundamentale interfibrilare şi a expansiunilor fibroblaştilor, transformărilor de tip. picnotic ale nucleilor fibroblaştilor, degranulării mastocitelor etc.[692]. La microscopul electronic, la 12 ore de la suprarenalectomie, s-a evidenţiat o reducere numerică a diametrelor fibrelor de colagen din derm, dar cu păstrarea periodicităţii caracteristice. Aceste modificări au dispărut după administrare de hidrocortizon [195], sugerînd că, în doze fiziologice, hormonul menţine integritatea structurală şi funcţională a fibrelor, pe cînd, în doze terapeutice, acţionează ca un factor alterativ. Efectul dominant al dozelor terapeutice este reducerea cantitativă a colagenului fibrilar, insolubil, efectul apărînd cu atît mai evident, cu cît animalul de experienţă este mai tînăr. Se explică, astfel, de ce, dacă se tratează un proces inflamator dermic cu cortizon, se produc pierderi ale colagenului fibrilar la distanţă de leziune, ca urmare a catabolizării anormale a fracţiei insolubile a colagenului [500]. Date experimentale au putut preciza intensitatea procesului de catabolism; la şobolani, de exemplu, sub acţiunea hidrocortizonului dispar, pe fiecare gram de piele proaspătă, 60 μ moli de hidroxiprolină şi aproximativ 3 μ moli de hexozamină [497]. Efectul apare după o singură administrare şi nu este aditiv. Se poate astfel corela piederea de colagen constatată biochimic, cu reducerea diametrelor şi numărului fibrelor fucsinofile, constatată pe secţiunile microscopice. Datele menţionate nu trebuiesc însă extrapolate cu uşurinţă la om, deoarece s-a constatat, că, după administrarea orală de prednison, 10 mg, de 3 ori pe zi în prima săptămînă, şi 5 mg de 4 ori pe zi, în a doua săptămînă, nu au putut fi observate modificări cantitative, statistic semnificative, ale hidroxiprolinei din piele [670]. De altfel, şi în cercetările experimentale, rezultatele obţinute trebuiesc corelate cu doza utilizată şi cu vîrsta animalului [762].

Există puncte de vedere diferite şi în ceea ce priveşte mecanismul prin care se reduce, în anumite condiţii experimentale şi la anumite animale de laborator, cantitatea de colagen din derm. Astfel, unele ipoteze sugerează, că prin blocarea sintezei s-ar produce o potenţare a catabolismului colagenului insolubil din fibre, punînd la dispoziţia organismului cantitatea adecvată pe care nu o mai poate obţine prin sinteze celulare, datorită efectului blocant al glucocorticoizilor. Alte ipoteze sugerează

Scanned with OKEN Scanner

acţiuni directe ale cortizonului, cu potenţarea activităţii hidrolazelor lizozomiale din fibroblaştii dermului. Unele date par să indice influenţe exercitate de glucocorticoizi şi asupra stabilităţii structurale a macromoleculelor. Astfel, la animale suprarenalectomizate, fibrele fucsinofile din derm devin mai solubile în soluţii cu variate concentraţii de clorură de sodiu, în comparaţie cu fibrele martore, de la animale intacte; administrarea de glucocorticoizi determină dispariţia acestei stări de hipostabilizare structurală. Aceasta ar sugera că, în condiţii fiziologice, cortizonul şi hidrocortizonul potenţează continua formare a legăturilor între macromoleculele de colagen din fibre, mărind gradul lor de insolubilitate, modificări considerate a sta la baza procesului de senescenţă. În legătură cu acelaşi subiect, menţionăm că s-a putut bloca efectul de desfacere a legăturilor intermoleculare din fibrele de colagen, exercitat de agenţii latirogeni, prin administrarea de cortizon [1079]. Astfel, la animalele tratate cu beta-aminoproprionitril s-au produs exostoze, hernii, anevrisme arteriale şi alte modificări caracteristice latirismului experimental, iar, la cele protejate prin cortizon, leziunile nu au fost constatate. Nu avem încă explicaţii satisfăcătoare asupra mecanismului prin care cortizonul poate bloca efectele *anti cross-linked* ale agenţilor latirogeni.

Cercetări efectuate la nivelul osului ridică probleme de un interes deosebit pentru clinică, terapia prelungită cu glucocorticoizi fiind uneori urmată de apariţia osteoporozei, fracturilor spontane, necrozelor aseptice ale capului humerusului sau femurului şi a altor leziuni rezultînd din efectele exercitate asupra matricei osoase. Aceste cercetări, ca şi la piele, au atras atenţia asupra dezechilibrului între intensitatea sintezei şi a degradării, apărut ca urmare a acţiunii cortizonului sau hidrocortizonului. Rezultatul acestui dezechilibru este predominanţa proceselor de rezorbţie asupra celor de neoformare, ducînd la instalarea progresivă a osteoporozei şi la favorizarea apariţiei fracturilor spontane. La animalele tinere, dezechilibrul între sinteză şi degradare interferează cu creşterea osului, alterările cele mai nete apărînd la nivelul cartilajului epifizar. La animalele adulte, domină evident procesul de rezorbţie osoasă, reflectat pe preparatele microscopice prin creşterea diametrelor lacunelor celulelor osoase, fuzionarea acestor lacune, reducerea numărului osteoblaştilor, subţierea trabeculelor şi formarea de focare de osteoliză. În plus, se văd înmulţiri ale capilarelor şi ale numărului de osteoblaşti. Administrarea intensivă de glucocorticoizi nu duce numai la rezorbţii, ci şi la formarea de zone de hiperosificare, mai ales experimental putîndu-se observa, la acelaşi animal, cicluri de rezorbţie şi de neoformare osoasă. Faptul că nu s-au semnalat creşteri, statistic semnificative, în eliminarea urinară a hidroxiprolinei după cure prelungite de glucocorticoizi, sugerează că procesul de osteoliză are o intensitate mult mai redusă în comparaţie cu cel întîlnit în alte disfuncţii endocrine. De altfel, se menţionează că rezultatele sînt mult influenţate de doza utilizată, particularităţile constelaţiei hormonale a animalului respectiv, specia şi starea nutriţională.

O atenţie particulară s-a acordat acţiunii inhibante a cortizonului asupra creşterii în lungime a oaselor, la copiii supuşi tratamentului cu

acest hormon. Fragmente de os, cultivate *in vitro* au demonstrat, că, sub influenţa cortizonului este inhibată proliferarea celulară şi încorporarea de sulf radioactiv în complexele mucoproteice ce vor forma matricea. Drept urmare, în locul condroitin-sulfaţilor, în mediul de cultură a apărut precursorul lor nesulfatat, condroitinul [631]. Se susţine că efectul de inhibare a formării matricei cartilajului este mai puţin dependent de doză, cît de specificitatea configuraţiei sterice a hormonilor. Astfel, *in vitro* s-a obţinut aceeaşi reducere a sintezei de mucopolizaharide şi cu 1,0 μg, şi cu 10—20 μg de hidrocortizon pe ml de mediu de cultură [197]. Dacă, însă, se utilizează un glucocorticoid fără hidroxilul de la C_{11}, sinteza de mucopolizaharide nu mai este inhibată. La microscop, efectul inhibant apare atît în secţiunile de matrice osoasă decalcificată, cît şi în cele de cartilaj, sub aspectul reducerii materialului metacromatic. Mecanismul prin care este degradată matricea pare să se bazeze, în primul rînd, pe efectele hidrolazelor acide eliberate de lizozomi şi, în al doilea rînd, pe efectele unor enzime cu proprietăţi glico- şi proteolitice cu sediul în citoplasma celulelor [499].

Un alt aspect al acţiunii glucocorticoizilor asupra ţesutului conjunctiv, îl evidenţiază studiul lichidului intraarticular. La acest nivel, glucocorticoizii au un efect particular, influenţînd, în primul rînd, gradul de polimerizare a acidului hialuronic. La bolnavii cu artrită reumatoidă, gradul de polimerizare este subnormal, rezultînd un lichid mai puţin vîscos, şi, în consecinţă, mai puţin adecvat funcţiei de lubricant al suprafeţelor articulare. Administrarea de glucocorticoizi, intraarticulară, parenterală sau peroralĕ, are acelaşi efect : revenirea la un grad fiziologic de polimerizare a lichidului sinovial [784].

Analiza amănunţită a acestor alterări a dus la ipoteza, că, în cursul procesului reumatic, celulele sinovialei sintetizează acid hialuronic cu greutate moleculară mai mică şi care formează mai greu complexe cu proteinele. Ca urmare a acestor alterări, efectul de „sită" exercitat de mucopolizaharid devine insuficient, nemai fiind excluse din masa lichidului sinovial macromoleculele cu un diametru mai mare al particulelor. Rezultatul cel mai evident al acestei deficienţe funcţionale este trecerea proteinelor plasmatice, prin bariera membranei sinoviale, spre cavitatea articulară şi acumularea lor în această cavitate. După administrarea glucocorticoizilor, capacitatea de sinteză a celulelor sinoviale este, la început, inhibată, rezultînd dispariţia treptată, atît a acidului hialuronic cu greutate moleculară inadecvată, cît şi a proteinelor serice acumulate în cavitatea articulară. După faza de inhibiţie, celulele încep să elaboreze acid hialuronic cu greutate moleculară normală, refăcîndu-se funcţia de barieră selectivă a membranei sinoviale, presiunea osmotică şi oncotică a lichidului intraarticular revenind la normal. Este greu de precizat dacă sinteza unui acid hialuronic cu greutate moleculară mică reprezintă rezultatul unei hiperactivităţi funcţionale a celulelor sinoviale, fără o specificitate fiziopatologică sau o alterare specifică bolii reumatismale. În orice caz, tendinţa de formare a unor macromolecule neadecvate trebuie combătută, glucocorticoizii reprezentînd cel mai eficace mijloc terapeutic de care dis-

punem astăzi. În afara cazurilor de artrită reumatoidă, nu au mai fost semnalate efecte de renormalizare a polimerizării acidului hialuronic sub acţiunea cortizonului, ceea ce ar sugera că sinoviocitele reprezintă celule „ţintă", cu sensibilitate particulară la anumite influenţe exercitate de către glucocorticoizi. Dimpotrivă, în culturi de ţesuturi de fibroblaşti, aceşti hormoni reduc gradul de polimerizare a acidului hialuronic sintetizat [199].

Combaterea efectelor secundare ale hormonilor glucocorticoizi asupra ţesutului conjunctiv este realizată, în parte, prin asocierea de hormoni consideraţi a avea acţiune anabolizantă. S-a demonstrat, atît la om, cît şi experimental, că, metiltestosteronul, de exemplu, poate înlătura, în parte, inhibiţia pe care glucocorticoizii o exercită asupra sintezei mucopolizaharidelor. Din asocierea celor două efecte, stimulant şi inhibant, medicul poate încerca să obţină modificări cît mai aproape de limitele normale. Trebuie, însă, avut în considerare că restabilirea acestui echilibru nu necesită aceleaşi doze pentru toate organele şi ţesuturile. De aceea, încercările de schematizare a diferitelor tratamente trebuie să se bazeze pe o cît mai bună cunoaştere a efectelor generale şi locale ale substanţelor administrate.

O ultimă problemă pe care o supunem discuţiei este aceea a interferenţei dintre cortizon şi histamină, dată fiind larga utilizare a glucocorticoizilor ca agenţi antiinflamatori. Anumite observaţii microscopice şi anumite date chimice au sugerat ipoteza că hormonii glucocorticoizi ar modela ţesutul conjunctiv din focarele de inflamaţie, în primul rînd prin intermediul variaţiilor cantitative locale ale histaminei şi, secundar, prin acţiune directă [934]. În sprijinul acestei ipoteze ar pleda observaţia, că, hormonii, administraţi la 2 zile după efectuarea unei plăgi, nu mai exercită efect inhibant asupra dezvoltării ei. Dacă animalul este tratat cu cortizon înaintea efectuării plăgii, acţiunea inhibantă apare destul de net. Întreruperea tratamentului cu 3 zile înainte de producerea leziunii face ca, din nou, efectul inhibant să dispară. S-a dedus, astfel, că eficienţa maximă a cortizonului se exercită în prima zi de existenţă a plăgii, cînd concentraţia locală de histamină are valorile maxime. Constatarea că şi *in vitro* cortizonul produce o scădere a sintezei de histamină a sugerat ipoteza că acţiunea antiinflamatoare este în mare măsură legată de acţiunea antihistaminică [935]. În sprijinul ipotezei menţionate, pledează şi existenţa unui paralelism între ritmul formării de histamină şi ritmul creşterii ţesutului de granulaţie [544]. S-a constatat că glucocorticoizii determină şi o scădere importantă a acidului ascorbic la nivelul plăgilor [205], sugerînd complexitatea mecanismelor prin care hormonii pot interveni în procesul de modelare a ţesutului conjunctiv.

Mineralocorticoizii

Efectele lor sînt în mare măsură superpozabile cu cele obţinute după administrare de hormon somatotrop hipofizar; ca şi acesta, mineralcorticoizii induc proliferarea fibroblaştilor şi neoformarea de fibre colagene [860].

Scanned with OKEN Scanner

Ca efecte particulare, notăm capacitatea de a induce o hidratare anormală a ţesutului conjunctiv, datorită retenţiei de sodiu, fapt ce se poate repercuta asupra fermităţii legăturilor intermoleculare. Tot în mod particular, sub acţiunea mineralocorticoizilor, pot apărea în ţesutul conjunctiv complexe macromoleculare anormale, de tipul fibrinoidului şi hialinului, a căror geneză a fost prezentată anterior.

Catecolaminele

Efectul noradrenalinei şi al adrenalinei asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv este extrem de puţin cunoscut. Experimental, în doze nefiziologice, adrenalina alterează structurile fibrilare ale pereţilor vasculari, determinînd procese reparatoare locale, cu acumulări de mucopolizaharide acide şi de colagen. Acţiunea concentraţiilor fiziologice nu a fost încă analizată, cu excepţia unor investigaţii *in vitro* asupra capacităţii de precipitare fibrilară şi redizolvare a fibrelor la variate temperaturi; din aceste experienţe a rezultat că adrenalina şi noradrenalina măresc considerabil stabilitatea structurală a macromoleculelor de colagen. Drept urmare, fibrele apărute în prezenţa catecolaminelor au prezentat o rezistenţă crescută faţă de agenţii care desfac legături electrostatice şi punţi de hidrogen, ca şi faţă de enzime specifice şi nespecifice, de tipul colagenazei şi al diferitelor proteaze [1155]. Fibrilele au un grad mai ridicat de contracţie termică, în comparaţie cu cele formate în absenţa adrenalinei, ceea ce ar sugera acelaşi proces de interconectare macromoleculară care măreşte stabilitatea structurală [409]. S-a mai constatat că, în special sub influenţa ceruloplasminei, catecolaminele ar acţiona ca substanţe purtătoare de radicali liberi, favorizînd apariţia de legături încrucişate intermoleculare.

Plecîndu-se de la aceste rezultate se poate ajunge la concluzia că adrenalina şi noradrenalina acţionează în organism modificînd ţesutul conjunctiv, în sensul favorizării apariţiei proceselor de „îmbătrînire".

Se sugerează trei mecanisme de acţiune prin care catecolaminele ar fi capabile să „îmbătrînească" colagenul, ca rezultat al inducerii unei multiplicări anormale a legăturilor intermoleculare: a) primul, ar include formarea de legături de hidrogen prin grupul hidroxil-fenolic; b) al doilea, cuprinde procese de oxidare a catecolului sau hidrochinonei în chinona corespunzătoare, ataşarea directă a grupelor amino ale colagenului la nucleul chinonic şi, ulterior, reacţii de polimerizare oxidativă; un astfel de proces ar interveni în consolidarea cuticulei la insecte; c) al treilea, se bazează pe formarea de radicali liberi semichinonici, care promovează formarea de legături intermoleculare între lanţuri polipeptidice alăturate ale macromoleculei de colagen [1155]. Frecvenţa cu care variatele *stress-uri* produc descărcări de adrenalină în cursul vieţii, impun studii mai numeroase asupra rolului pe care catecolaminele l-ar putea avea ca agenţi de interconectare a macromoleculelor de colagen şi, implicit de „îmbătrînire" a ţesutului conjunctiv.

Scanned with OKEN Scanner

Estrogenii

Efectele modelatoare ale estrogenilor asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv fibros şi fibrocartilaginos sînt binecunoscute prin studiul involuţiei post partum a uterului, relaxarea simfizei pubiene în cursul naşterii, modificările ciclice din pielea sexuală a maimuţelor etc. Menţionăm, de asemenea, lucrările care au atras atenţia că administrarea acestor hormoni la animalele castrate determină dezvoltarea unei fibroze interstiţiale a uterului, ca şi o fibromatoză difuză subperitoneală [260] sau hialinizări ale pereţilor vaselor uterine [657]. De asemenea, au apărut foarte demonstrative, din acest punct de vedere, observaţiile că prelungirea lactaţiei accentuează catabolismul intens al ţesutului conjunctiv din uterul post partum, inhibînd pe o durată mai lungă, reapariţia sintezei normale a estrogenilor [262]. Un efect similar prelungirii lactaţiei a fost obţinut şi după ovariectomie [454].

Acţiunea modelatoare a estrogenilor asupra ţesutului conjunctiv se exercită pe teritorii şi pe structuri foarte variate, de la fibrele reticulinice din uter, la ţesutul elastic din derm şi de la colagenul mineralizat din os, la substanţa fundamentală a arterelor. Spaţiul nu ne permite să prezentăm amănunţit toate aceste efecte, limitîndu-ne doar la anumite exemplificări.

La nivelul uterului, ţesutul conjunctiv din endometru apare ca o importantă „ţintă" a estrogenilor, numeroşi autori constatînd că formarea unei reţele de fibre colagene şi reticulinice este condiţionată de un anumit nivel al estrogenilor endogeni sau de o anumită cantitate de hormoni de substituţie. De exemplu, administraţi la femela castrată, estrogenii de sinteză fac să apară reţeaua reticulinică şi de colagen la 10 zile post partum, în timp ce, sub influenţa hormonilor, secretaţi în condiţii fiziologice, sînt necesare aproximativ 20 de zile pentru ca aglomerările de fibre să fie vizualizate [314]. Lactaţia prelungită, inhibînd sinteza estrogenilor, întîrzie şi mai mult formarea de fibre în endometru. Existenţa celor mai mari valori ale hidroxiprolinei în cursul estrului, pledează, de asemenea, pentru efectul stimulator fibrilogenetic al estrogenilor [454]. Efectul stimulator este demonstrat şi de acumularea masivă de colagen în perioada ce precede naşterea, precum şi de brusca involuţie post partum a ţesutului conjunctiv din uter, o dată cu prăbuşirea valorilor estrogenilor circulanţi. Dacă se administrează estrogeni, această involuţie este împiedicată. Întrucît s-a sugerat că ar fi vorba de eliberarea masivă de enzime glico— şi proteolitice din celulele endometriale, o dată cu scăderea sub un anumit prag a estrogenilor, s-ar părea că în condiţii fiziologice, aceşti hormoni au capacitatea de a bloca procesul de eliberare a enzimelor lizozomiale din uter [412]. La baza mecanismului de neoformare a fibrelor de colagen din uter sub acţiunea estrogenilor ar sta capacitatea acestor hormoni de a potenţa procesul de transformare a prolinei în hidroxiprolină şi a lizinei în hidroxilizină [549]. Doza necesară stimulării formării de ţesut conjunctiv în endometru ar fi de 1 μg şi timpul eficace de acţiune, de 16 ore. Dintre toate preparatele, cel mai activ s-a dovedit, din acest punct de vedere, estradiolul.

Scanned with OKEN Scanner

Numărul extrem de mare de osteoporoze de menopauză, întîlnite în clinică, au incitat studierea acţiunii modelatoare a estrogenilor asupra ţesutului osos. Spre deosebire de efectul stimulator asupra formării colagenului, constatat la nivelul uterului, în os pare să fie vorba de un efect mult mai complex; astfel, în osteoporoză, care se însoţeşte de o reducere a volumului matricei şi al fibrelor incluse în ea, s-au evidenţiat uneori scăderi brusce, acute, ale valorilor sanguine ale estrogenilor, în timp ce, în alte cazuri, aceste valori erau în limitele convenţional considerate ca normale sau chiar le depăşeau. În sprijinul efectului decalcifiant al lipsei de estrogeni ar pleda unele observaţii de anatomie comparată, care atestă apariţia de hiperosificări la păsări după fiecare perioadă de ovulaţie, proces amplificat prin administrare de estrogeni. De asemenea, dispariţia, ca urmare a tratamentului cu estrogeni, a osteoporozei indusă la păsări prin cortizon, argumentează pentru aceeaşi concluzie. Ea poate ajuta şi la explicarea observaţiei clinice, că, administrarea de estrogeni grăbeşte apariţia centrelor de osificare, închizînd evoluţia cartilajelor de creştere. Excesul de hormon are efecte mai grave, ducînd la zone de hiperosificare (cu mărirea densităţii osului), la hialinizarea matricei şi la inhibarea procesului de degradare fiziologică [997]. De aceea, problema dozei administrate pare să fie de o considerabilă importanţă în interpretarea rezultatelor. Astfel, administrarea la şoareci castraţi a unor cantităţi de 0,1 — 20 μg a permis să se constate că dozele cele mai mici accelerau creşterea liniară a oaselor lungi, determinînd, în acelaşi timp, o rezorbţie a trabeculelor metafiziei. Dimpotrivă, dozele cele mai mari inhibau creşterea în lungime şi rezorbţia trabeculelor, stimulînd osteogeneza endostală. Astfel, în funcţie de cantitatea administrată, estrogenii pot acţiona sinergic cu hormonul somatotrop hipofizar asupra creşterii liniare a oaselor lungi şi pot, concomitent, să potenţeze procese catabolice în metafiză, acţionînd sinergic cu hormonul paratirodian şi influenţînd mecanismul de *feed-beck* din metabolismul calciului [1050].

Efectele modelatoare ale estrogenilor asupra osului nu apar cu aceeaşi intensitate la toate speciile, la toate vîrstele şi chiar la toate oasele. Astfel, la şobolani, sub influenţa aceleiaşi doze de estrogeni s-a produs o inhibare, cu 29% faţă de martori, a sintezei de colagen din matricea oaselor, iar, la şoarece, sinteza a fost mărită cu 44% [1086].

Atrag atenţia, de asemenea, observaţiile care indică lipsa de eficienţă a estrogenilor asupra sintezei colagenului în culturi de ţesuturi, sugerînd că acţiunea lor ar necesita un complex de condiţii ce nu există decît *in vivo*. În interpretarea rezultatelor trebuie luat în consideraţie şi sexul, constatîndu-se, de exemplu, că, la şobolani, sub acţiunea estrogenilor, numai femela prezintă hiperosificări ale cartilajului hialin [997]. În privinţa mecanismului intim de acţiune, investigaţiile efectuate pînă acum tind să sugereze că ar fi vorba, în primul rînd, de o potenţare a modelării funcţionale de tip osteoblastic a fibroblaştilor sau a celulelor mezenchimale nediferenţiate. Transformarea masivă a unor elemente conjunctive spre celule de tip osteoblastic, specializate în elaborare de matrice osificabilă, a fost observată în special după doze mari de estrogeni. În acest mod, cantitatea

de colagen elaborată sub acţiunea estrogenilor creşte proporţional cu numărul de celule care sintetizează această macromoleculă [1004].

Acţiunea estrogenilor asupra cartilajului a fost sugerată ca subiect de cercetare tot de observaţii clinice, care au corelat procesele osteoartrozice, cu apariţia menopauzei. Cînd nivelul estrogenilor scade, se reduce şi numărul de celule stimulate să sintetizeze colagen, rezultînd o alterare progresivă a tuturor proprietăţilor visco-elastice şi mecanice ale cartilajului articular reflectate prin apariţia zonelor de erodare. O dovadă a acţiunii stimulatoare, exercitată de estrogeni asupra condroblaştilor şi condrocitilor, o constituie modificările ultrastructurale ce apar în urma administrării acestor hormoni. Ele se caracterizează prin dezvoltarea reticulului endoplasmic, a granulelor de ARN şi a aparatului Golgi, reflectînd o mărire a capacităţii de sinteză proteică a celulei. Faptul că la periferia acestor elemente se acumulează un număr tot mai mare de fibrile colagene, cu variate grade de maturizare, sugerează că produsul secretor dominant este macromolecula de colagen [999]. În acelaşi timp cu stimularea sintezei colagenului, pot să apară aspecte de inhibare a încorporării de radiosulfat, traducînd o diminuare a sintezei mucopolizaharidelor acide sulfatate. Anumiţi autori consideră reducerea încorporării de sulf radioactiv în cartilaj ca un efect specific al estrogenilor, efect ce nu pare influenţat de prezenţa sau absenţa hipofizei [878]. În afara diminuării sintezei mucopolizaharidelor acide sulfatate, s-au mai notat reduceri ale conţinutului în apă, sodiu, clor şi fosfat, precum şi scăderi cantitative ale complexelor glicoprotidice, conţinînd hexozamine [116]. Menţionăm că efectul de blocare a încorporării de sulf radioactiv, reflectînd inhibarea sintezei mucopolizaharidelor acide sulfatate, este evident după aproximativ 3 zile de la administrarea estrogenilor şi poate fi, parţial sau total, eliminat prin tratare cu testosteron [877].

La nivelul pielii, aplicarea locală de estrogeni face să dispară o serie de alterări ale colagenului, particulare procesului de îmbătrînire [393]. S-au notat variaţii în funcţie de sex, estradiolul în doze de 3 — 6 gamma /100 g greutate corporală reducînd, la şobolanii masculi, cantitatea de colagen din derm, şi mărind-o la femele [1014]. Acidul hialuronic a prezentat o creştere a gradului de polimerizare [521], asociată cu o diminuare a permeabilităţii, atît interstiţiale, cît şi vasculare [952]. În plăgile dermului, apar, de asemenea efecte de potenţare a sintezei colagenului, mult mai nete la femelele ovariectomizate, decît la cele intacte [550].

O ultimă problemă de interes clinic, legată de capacitatea estrogenilor de a modela ţesutul conjunctiv, este aceea a influenţelor exercitate asupra peretelui arterial. Importanţa acestui subiect a fost amplificată de constatarea, că, acest teritoriu poate converti estrona în estradiol şi estrona-sulfat în estronă şi estradiol, precum şi de constatarea că, în peretele arterelor, hormonii de tipul estrogenilor se găsesc în concentraţii mai mari decît în sînge [204]. Este greu de apreciat dacă această constatare permite să se includă şi peretele arterial printre organele „ţintă" ale estrogenilor. În sprijinul unei astfel de afirmaţii ar pleda şi observaţia că mucopolizaharidele din intima aortei prezintă variaţii cantitative şi calitative, ce

Scanned with OKEN Scanner

se suprapun ciclului ovarian [648], precum şi constatarea că acumularea de mucopolizaharide în peretele arterial creşte paralel cu diametrul foliculului ovarian, atingînd maximum cînd hormonul foliculostimulant îşi încetează activitatea. Tot pe aceeaşi linie s-ar putea înscrie şi constatarea, că, peretele aortei de la şobolanul femelă are, faţă de leziunile produse prin adrenalină, o capacitate de reparare mult mai eficientă, în comparaţie cu masculul, sugerîndu-se că estrogenii ar stimula acest proces de reparaţie [669]. Toate aceste date experimentale încearcă să dea anumite răspunsuri la problema, ridicată de clinică, privind relativa „imunitate" a femeilor în premenopauză la complicaţiile aterosclerozei, constatare care a sugerat implicarea estrogenilor în explicarea mecanismului acestei rezistenţe. Pe de altă parte, în doze nefiziologice, estrogenii alterează structurile fibrilare ale peretelui vascular, în special cele elastice, apărînd aspecte de fragmentare, subţiere, reduplicare şi dezorganizare, asemănătoare celor întîlnite în arterele placentei înainte de naştere [254].

Progesteronul

Are un efect opus estrogenilor asupra creşterii oaselor lungi, întîrziind calcificarea [997]. Uterul, în faza progesteronică, prezintă o inhibare în formarea fibrelor reticulinice şi de colagen din endometru, asociată cu o tumefiere edematoasă a substanţei fundamentale. După tratamente cu progesteron se pot constata reduceri ale diametrelor fibrelor şi alterări ale afinităţii lor tinctoriale. Plăgile uterului se închid mai greu în perioada de predominanţă progesteronică, în comparaţie cu cea foliculinică [1152]. Analiza mecanismului de acţiune a progesteronului asupra ţesutului conjunctiv este însă departe de a fi elucidat. Studii cu glicină şi prolină marcată ar sugera că sinteza colagenului este potenţată; totuşi, nu apare o neoformare de fibre, datorită incapacităţii macromoleculelor de a agrega sub forma fibrilară insolubilă, probabil ca urmare a unui deficit în formarea legăturilor intermoleculare. Aceasta a făcut pe anumiţi cercetători să compare efectele progesteronului asupra maturării fibrelor, cu acelea ale agenţilor latirogeni [600]. Un alt mecanism de acţiune a progesteronului pare a se exercita prin intermediul enzimelor serice. Experimental, animalele tratate zilnic cu 0,5 mg progesteron prezintă o importantă creştere a activităţii catepsinelor. Creşterea nu mai apare dacă se administrează, concomitent, un hormon glucocorticoid. Plecîndu-se de la aceste date s-a completat ipoteza menţionată, în sensul, că, hidrolaze acide de tipul catepsinei ar împiedica maturarea fibrilelor şi aglomerarea lor în fibre, menţinînd un *pool* anormal de colagen solubil, în raport cu cel insolubil. Prin acelaşi mecanism s-ar explica şi degradarea masivă a colagenului solubil, apărută după administrarea anumitor doze de progesteron [491].

Androgenii

Utilizarea acestor hormoni ca modelatori ai ţesutului conjunctiv este larg răspîndită, mai ales pentru prevenirea şi tratamentul osteoporozei. Se pare că androgenii ar avea capacitatea da a interfera acţiunea cortizonului asupra metabolismului osului, după cum, la nivelul cartilajului, interferează pe aceea a hormonului somatotrop hipofizar. Ambele tipuri de interferenţă pot fi observate cu ajutorul biopsiilor repetate. Susceptibilitatea osului la aceste tratamente variază, însă, în funcţie de vîrstă, efectul maxim fiind obţinut la pubertate [1017]. La adulţi se constată rezultate bune mai ales în procesul de reparare a fracturilor, adrogenii stimulînd apariţia unei matrice care se mineralizează rapid, prin numeroase centre de osificare [221]. Efectul de potenţare a fost semnalat şi la nivelul plăgilor, unde se măreşte intensitatea proceselor inflamatoare locale, precum şi ritmul proliferării fibroblastice şi histiocitare, al acumulării de substanţă fundamentală şi al formării de fibre de colagen, grăbindu-se, astfel, cicatrizarea [922]. Doza este foarte importantă, cu 0,5 mg de metiltestosteron obţinîndu-se la şoarece, o accelerare a cicatrizării plăgilor, iar cu 1 mg, o inhibare destul de netă. Efectul stimulator este interferat de administrarea simultană a cortizonului [75]. Efectul de potenţare a proliferării plăgilor a apărut cu intensităţi similare la ambele sexe, ca aspect morfologic dominant manifestîndu-se hiperplazia şi hipertrofia fibroblaştilor [239]. Mecanismul intim de acţiune a androgenilor asupra ţesutului conjunctiv este încă neprecizat, dar se subliniază capacitatea lor de a stimula sinteza tuturor tipurilor de acizi ribonucleici în celulele mezenchimale [535].

*

În încheierea acestui subcapitol, menţionăm trei procese deosebite, care exemplifică modelarea profundă a ţesutului conjunctiv sub acţiunea hormonilor sintetizaţi de glandele genitale, în primul rînd, şi a celorlalte glande endocrine, pe un plan mai mult sau mai puţin secundar; este vorba de procesele de: 1) ovulaţie; 2) relaxare a simfizei pubiene; 3) involuţie post partum a uterului.

1). Se consideră lichidul din foliculii ovarului ca o varietate de substanţă fundamentală a ţesutului conjunctiv, adaptată *procesului de dezvoltare şi migrare a ovulului*. Datorită bogăţiei în mucopolizaharide acide, mucina din foliculii ovarieni apare metacromatică la albastru de toluidină, mai ales cînd diametrul foliculului respectiv este sub 500 μ. Ulterior, pe măsură ce acest diametru se măreşte, metacromazia scade ca intensitate, reflectînd scăderea gradului de polimerizare a mucopolizaharidelor cu cît foliculul devine mai matur. Aspectele de maturare pot fi obţinute şi în mod artificial, incubînd, *in vitro*, lichidul folicular cu hialuronidază testiculară [1213]. Astfel, prin intermediul variaţiilor de intensitate a metacromaziei se pot obţine informaţii asupra gradului de maturare a fiecărui folicul ovarian, ortocromazia apărînd în stadiul de preovulaţie. În determinarea procesului de ovulaţie, un rol important pare să fie jucat de anumite enzime

Scanned with OKEN Scanner

proteolitice, mai ales cele cu acţiune de tipul colagenazei şi a papainei. Administrarea acestor enzime grăbeşte apariţia ovulaţiei, prin efectul degradant pe care îl au asupra ţesutului conjunctiv ce înconjură foliculul. S-a putut preciza că o cantitate de 1 µl dintr-o soluţie 10% de colagenază reprezintă limita inferioară de enzimă, necesară pentru a declanşa ruptura foliculului, proces ce apare la aproximativ 10 minute de la administrarea fermentului. Similaritatea modificărilor histologice, cu cele constatate în cursul ovulaţiei fiziologice, a sugerat ipoteza că o creştere a concentraţiei colagenazelor în lichidul folicular ar reprezenta mecanismul principal care guvernează ruptura foliculului [308]. După ovulaţie, mucopolizaharidele acide rămîn concentrate în jurul ovulului, trebuind să se exercite asupra lor acţiuni de tip hialuronidazic, spre a se asigura pătrunderea spermatozoizilor şi efectuarea fecundaţiei. Deşi, în principiu, un singur spermatozoid este necesar pentru ca fecundaţia să aibă loc, în realitate trebuie să fie prezenţi un număr considerabil, spre a elimina cantitatea adecvată de enzime care să degradeze mucopolizaharidele şi să libereze drumul spre ovul. Constatarea, că, la femeile cu sterilitate primară, tratate cu hialuronidază testiculară, s-au obţinut rezultate pozitive în 26 % din cazuri, în comparaţie cu numai 10 % rezultate pozitive după variate alte terapeutici [1009], îşi poate găsi o explicaţie satisfăcătoare în datele menţionate.

2). *Relaxarea simfizei pubiene* reprezintă un proces extrem de interesant, legat de modelarea hormonală a ţesutului conjunctiv. Procesul este caracterizat prin transformarea ţesutului osos în cartilaj, a cartilajului în ligament, spre a evolua, apoi, către *restitutio ad integrum*. Investigaţii efectuate la şoarece au evidenţiat, că, în cursul ultimelor zile ale gestaţiei, se formează între oasele pubisului un ligament de 3 — 5 mm. Dinamica formării acestui ligament începe cu demineralizarea anumitor teritorii osoase şi apariţia unei matrice cartilaginoase. Ulterior, cartilajul ia aspect tînăr, bogat în celule înconjurate de mici acumulări de condroitin-sulfaţi A şi C. După interpunerea acestor insule cartilaginoase între fragmentele de os, se constată evoluţia lor spre un ţesut condroid, în masa căruia se dezvoltă numeroase fibre conjunctive [1087]. Zonele cu bogată acumulare de fascicole groase fucsinofile iau treptat aspect de ligament, în timp ce, resturile de matrice cartilaginoasă sînt împinse la periferia ligamentului, iar cele care rămîn central sînt înlocuite cu ţesut fibros. În timp ce cartilajul era avascular, ligamentul este bogat vascularizat prin capilare de neoformaţie. După naştere, la numai 8 ore, ligamentul se scurtează cu 2,5 — — 3 mm, prezentînd alterări ale fibrelor, dispariţia fucsinofiliei, reapariţia unor zone cu acumulări de condroitin-sulfaţi, infiltrate limfohistoicitare. În mici teritorii, fragmentarea fibrelor colagene duce la formarea unor mase amorfe ce sînt fagocitate de celulele de infiltraţie. În alte zone, dispariţia fibrelor este urmată de reapariţia ţesutului condroid. Ulterior, micile insule de ţesut condroid fuzionează şi alcătuiesc zone întinse de ţesut cartilaginos matur. Într-o fază finală, matricea cartilajului se mineralizează, reapărînd aspectul iniţial al osului. Toate aceste transformări, de la os, la ligament şi de la ligament, la os, pot fi reproduse experimental după administrare

Scanned with OKEN Scanner

de relaxină, apărînd mai evidente la animalele supuse anterior unui tratament cu estrogeni [243].

3). *Modificările uterului în cursul sarcinii* sînt extrem de complexe. Ne vom limita să prezentăm doar dilatarea cervixului și involuția post partum.

Dilatarea cervixului reprezintă un exemplu deosebit de interesant asupra modului în care constelația hormonală din perioada ce precede nașterea poate modela țesutul conjunctiv. Este bine cunoscută fermitatea și rezistența la tracțiune a cervixului, al cărui perete prezintă, în mod fiziologic, un grad extrem de redus de extensibilitate. Din această cauză, dilatarea orificiului de intrare în cavitatea uterină a constituit, și constituie încă, o problemă destul de greu de rezolvat. Totuși, același țesut conjunctiv, la sfîrșitul perioadei de gestație, capătă proprietăți noi, devenind de o extensibilitate uimitoare, care permite o considerabilă dilatare fiziologică a cervixului. Modul în care sînt modificate, calitativ și cantitativ, variatele componente ale țesutului conjunctiv, spre a se ajunge la dilatare, a fost extrem de puțin studiat pînă acum. La șobolan, femela la pubertate conține în cervix 5 — 10 g de colagen/100 g greutate umedă a organului. În cursul gestației, această cantitate scade progresiv, ajungînd, cînd dilatarea este la maximum, la aproximativ jumătate din valoarea inițială. În afara acestor modificări cantitative, se reduce progresiv și rezistența mecanică a fibrelor, care devin extrem de ușor extensibile [455]. Reducerea la jumătate a cantității de colagen, într-un teritoriu de organ care își mărește în acest timp de aproximativ 2 ori și jumătate volumul și își dilată de 3 — 4 ori circumferința canalului central, presupune o redistribuire a fibrelor. Redistribuirea se efectuează fără alterarea integrității morfologice, caracterizîndu-se prin disocierea fasciculelor groase, în benzi din ce în ce mai subțiri și împrăștierea acestor benzi pe o mare suprafață de țesut, între celulele musculare netede, precum și prin acumulări de substanță fundamentală mucinoasă. Modificări similare au fost observate experimental după administrare de relaxină [455]. S-a sugerat, că, un anumit tip de substanță fundamentală ar determina marea extensibilitate a fibrelor incluse în ea, dar nu dispunem de dovezi concludente în fundamentarea acestei ipoteze. Imediat după naștere, cantitatea de colagen din cervix continuă să scadă, conținutul în hidroxiprolină la om fiind de 10,2 $\pm$ 1,76 % înainte de naștere, și de 4,7 $\pm$ 1,54 %, în perioada post partum [253].

Reamintim că, pînă la vîrsta de aproximativ 30 de ani, colagenul din uter crește progresiv, rămîne constant între 30 și 50 de ani și diminuă, treptat, între 50 și 65 de ani, devenind, în același timp, mai rezistent la digestia cu colagenază [1188]. Se pare că ar exista și un patern mai deosebit al aminoacizilor colagenului din uter, care, în comparație cu cel din derm de exemplu, conține mai multă hidroxiprolină, hidroxilizină, glicină și acid aspartic și mai puțină prolină, alanină și valină [552]. Menționăm, că, spre deosebire de alte organe, uterul își păstrează, nealterată de vîrstă, capacitatea de a sintetiza colagen, constatare rezultată din observații experimentale [548].

Scanned with OKEN Scanner

Procesul de involuţie post partum a uterului se caracterizează printr-o degradare a fibrelor de colagen într-un ritm şi cu o intensitate ce nu are comparaţie în organismul uman şi al animalelor de laborator. Astfel, în atrofiile de membre se pierde 45 % din colagenul iniţial, din tiroida blocată prin tiouracil dispare 30 % din colagen, în ciroza reversibilă reducerea colagenului atinge cel mult 35 %, pe cînd, în uterul post partum, dispare 90 % din cantitatea iniţială de colagen [457]. Mai menţionăm, că, în uterul la termen, cantitatea de colagen este de aproximativ 8 ori mai mare decît înainte de gestaţie, aproximativ 97 % din colagen găsindu-se sub formă de fracţie insolubilă [763]. Mecanismul prin care se produce degradarea masivă a unui colagen insolubil constituie un permanent subiect de investigaţie. S-a constatat că extractul de uter este capabil să degradeze fibrele de colagen în peptide, dintre care aproximativ 50 % sînt dializabile [948]. Acest efect apare cu intensitate maximă la un pH de 3,3 şi se bazează, în special, pe acţiuni de tipul catepsinelor. Studiul enzimelor conţinute în uter a evidenţiat catepsine acide, alături de beta-glucuronidaze, beta-galactozidaze şi proteaze variate. Ele scad semnificativ înainte de naştere şi cresc semnificativ post partum, atingînd valorile maxime în perioada cînd involuţia uterului este maximă [1189]. Absenţa unor enzime de tip colagenazic şi a unor factori care să denatureze colagenul spre a-l face susceptibil acţiunii proteazelor existente în ţesutul uterin, lasă fără răspuns întrebarea prin ce mecanism se produce involuţia uterului. Încercările de a găsi, în eliminările urinare de hidroxiprolină, o reflectare a ritmului de degradare a colagenului din uter, nu au dus la rezultate satisfăcătoare. S-a constatat, că, în cursul ultimului trimestru al sarcinii, se pot detecta creşteri ale valorilor urinare ale hidroxiprolinei şi, că, nivelul maxim este atins imediat după naştere, după care urmează o scădere bruscă. Calculîndu-se, însă, cantitatea de colagen rezorbită din uter şi cea considerată a fi degradată pe baza valorilor urinare ale hidroxiprolinei, s-a ajuns la concluzia că numai 5 — 10 % din aceste valori sînt legate de procesul de involuţie uterină, restul rezultînd, probabil, din procese de osteoliză şi condroliză, în special din osteomalacia „fiziologică" ce însoţeşte sarcina [763]. Aceste constatări au sugerat ipoteza că cea mai mare parte a colagenului din uter ar fi reutilizată de organism, ipoteză ce îşi aşteaptă verificarea.

Un alt aspect, rezultat din modelarea hormonală a uterului, îl constituie modificările din zona de implantare a oului. Aci au loc procese de degradare a fibrelor de colagen, de subţiere şi fragmentare a membranelor bazale, de acumulări de substanţă fundamentală, de neoformare capilară etc. [314]. Aceste aspecte au fost comparate cu cele din dezvoltarea unei plăgi. Efectele particulare ale fiecărei acţiuni hormonale rămîn să fie studiate în viitor, în scopul obţinerii unor date utile pentru o terapeutică aptă să asigure condiţii adecvate de dezvoltare a embrionului.

Scanned with OKEN Scanner

VITAMINE

Vitamina C

Frecvenţa cu care vitamina C este recomandată în cele mai variate manifestări clinice sau preclinice, în perioadele de convalescenţă, în perioadele de creştere a organismului etc. impune cunoaşterea cît mai adîncă a modului cum acţionează acidul ascorbic asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv. Nu este vorba de o necesitate de ordin teoretic, ci în primul rînd de ordin practic, întrucît utilizînd aceeaşi substanţă, putem favoriza ritmul de vindecare a plăgilor sau fracturilor, dar putem favoriza şi dezvoltarea fibrozelor difuze viscerale.

Descrierea primelor cazuri de scorbut, cu plăgi ulcerate care nu prezentau tendinţă la vindecare, cu fracturi deschise fără tendinţă la consolidare, a atras atenţia asupra gravelor modificări ce apar în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv. Analiza ulterioară a acestor modificări a demonstrat că acidul ascorbic intervine în procesele de sinteză a colagenului şi mucopolizaharidelor, în procesul de agregare fibrilară a colagenului şi de formare a substanţei fundamentale şi a membranelor bazale din pereţii capilarelor, în procesul de mineralizare a matricei osoase. Toate etapele metabolice principale, evidenţiate în celulele ţesutului conjunctiv, par mai mult sau mai puţin influenţate de acidul ascorbic, anumite lucrări sugerînd chiar că ar putea participa ca piatră constitutivă în formarea anumitor tipuri de mucopolizaharide.

Studiile efectuate în acest domeniu s-au izbit de o mare dificultate, determinată de carenţele complexe ce apar la animalele supuse la un regim lipsit de vitamina C. Aceste carenţe modifică metabolismul celulelor, constelaţia endocrină, reglarea nervoasă, făcînd greu de separat alterările rezultate din lipsa vitaminei C, din cele provocate de regimul carenţial. Cu aceste rezerve, vom începe prin a prezenta modificările constatate la nivelul fibroblaştilor la animalele cu scorbut.

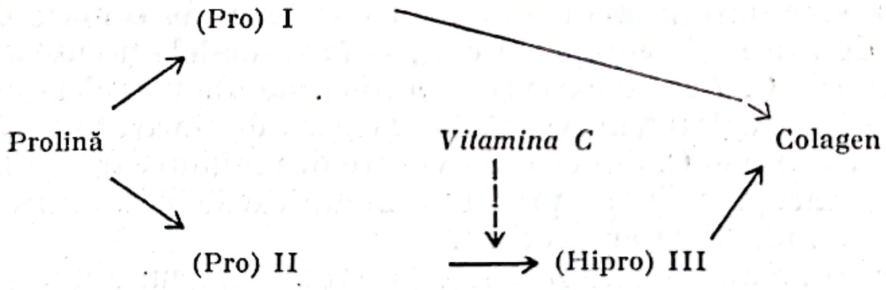
Trei tipuri de alterări au fost menţionate pînă acum în ultrastructura fibroblaştilor şi anume: 1) un reticul endoplasmic de volum redus, cu mici canale ovoide, înguste, discontinui, alternînd cu dilataţii saciforme, conţinînd uneori lipide; 2) eliminarea din celulă a unor macromolecule care, ajunse la periferia fibroblastului, nu au tendinţa de agregare în fibrile şi, dacă procesul de agregare a avut loc, nu prezintă periodicitatea caracteristică colagenului; 3) o încorporare mai lentă a prolinei marcate decît în fibroblastul normal şi o stagnare intracelulară a radioizotopului, sugerînd un proces mai lent de sinteză.

Se acceptă ca dovedită existenţa în fibroblastul normal a unui anumit patern de dispoziţie a ribozomilor, caracterizat prin mai multe rînduri aliniate paralel, apărînd sub forma unor trasee ondulate, alternînd cu porţiuni rectilinii [824]. O astfel de dispoziţie ar reflecta prezenţa de poliribozomi, legaţi prin matricea formată de acidul ribonucleic mesager.

Scanned with OKEN Scanner

În scorbut, această dispoziţie dispare, dar poate fi normalizată dacă se administrează acid ascorbic, aspectul normal apărînd la aproximativ 4 ore de la administrare [917]. După ce aspectul ribozomilor a reintrat în paternul obişnuit, la periferia celulei se poate constata formarea de fibrile de colagen cu periodicitatea caracteristică. Dacă se acceptă ipoteza că ARN mesager formează matricea prin care sînt uniţi cei aproximativ 30 de ribozomi pentru alcătuirea fiecărui lanţ polipeptidic al macromoleculei de colagen (fiind deci necesară o aglomerare de aproximativ 100 de astfel de formaţiuni spre a lua naştere helixul trispiralat), apare cu claritate că alterarea iniţială, determinată de lipsa acidului ascorbic, se repercutează asupra tiparului macromoleculei. La baza alterării pot coexista : reduceri cantitative sau modificări calitative ale ARN mesager, reduceri cantitative sau modificări calitative ale ribozomilor, disfuncţii ale membranelor reticulului endoplasmic, imposibilitatea formării unor mari agregate poliribozomale.

O altă etapă în sinteza colagenului, influenţată de acidul ascorbic, este transformarea prolinei în hidroxiprolină, precum şi a lizinei în hidroxilizină, ambele procese de hidroxilare avînd loc numai în prezenţa acestei substanţe [211, 908]. Existenţa iminoacizilor hidroxilaţi numai în colagen şi rolul jucat de acidul ascorbic în procesul de hidroxilare, ne ajută să înţelegem de ce vitamina C este extrem de necesară unui ţesut care produce mult colagen şi mai puţin necesară unui ţesut sau organ care sintetizează alte tipuri de proteine. S-a propus următoarea schemă, privind locul de acţiune a vitaminei C în procesul de transformare a prolinei în hidroxiprolină [1039].



Prolina I va intra în lanţul polipeptidic al macromoleculei de colagen ca aminoacidul prolină ; prolina II se va transforma în aminoacidul hidroxiprolină, în prezenţa vitaminei C. Acest proces necesită apariţia unor produşi intermediari între tipul II şi III, care, în lipsa acidului ascorbic, se vor acumula în citoplasma fibroblaştilor şi vor fi eliminaţi din celule fără să participe ulterior la formarea fibrilelor. De aceea, ţesuturile animalelor scorbutice conţin o cantitate anormal de mare de prolină şi o cantitate anormal de mică de fibre de neoformaţie.

Ca o completare la acţiunea exercitată de acidul ascorbic în procesul de hidroxilare a prolinei, menţionăm că acest acid influenţează şi activitatea colagen-prolin-hidroxilazei, jucînd rol de cofactor al respectivei enzime. În acest sens el este folosit ca donator specific de electroni, alături de ionul feros, care funcţionează ca agent de transfer al

Scanned with OKEN Scanner

electronilor [517]. Toate aceste constatări au dus la concluzia că în organele şi ţesuturile unde este solicitată o sinteză importantă de colagen, există un paralelism între nivelul sintezei şi concentraţia locală de acid ascorbic, la o concentraţie maximă corespunzînd o sinteză maximă [224]. Astfel, în uter, în prezenţa vitaminei C s-au format 70 mg colagen, iar în absenţa ei numai 9 mg [908]. Menţionăm că, experimental, absenţa vitaminei C împiedică formarea dentinei şi smaltului [359]. Creşterea ţesutului osos pare, de asemenea, strîns dependentă de nivelul concentraţiei vitaminei C [534]. S-a putut stabili că la doze între 5 şi 50 μg de vitamină C, ritmul creşterii osului este paralel cu mărirea dozei, rămînînd constant mărit dacă doza depăşeşte 50 μg. Efectul stimulator al vitaminei C dispare la aproximativ 24 de ore de la întreruperea administrării [840]. Aceste observaţii experimentale ar putea explica de ce fracturile tratate cu calciu şi vitamina C se vindecă într-un interval de timp cu 25-33% mai scurt, decît cele netratate. Consolidarea apare şi mai netă dacă, pe lîngă vitamina C şi calciu, se asociază şi un hormon cu acţiune anabolică [1007]. Dimpotrivă, în lipsa vitaminei C, apare un calus cu o matrice alterată, bogată în substanţă fundamentală şi săracă în fibre colagene, cu un număr redus de osteoblaşti şi cu puţine centre de osificare [373]. Efectul stimulant pare dependent şi de natura preparatului administrat, cu aceeaşi doză de galascorbin, obţinîndu-se o sinteză mult mai evidentă a colagenului în variate organe decît prin injectare de acid ascorbic [992].

Toate aceste date atrag atenţia asupra necesităţii asigurării unor cantităţi corespunzătoare de acid ascorbic de-a lungul tuturor perioadelor de elaborare a unor cantităţi mai mari de colagen: creşterea în lungime a oaselor, apariţia dinţilor, evoluţia plăgilor, reacţiile de încapsulare a tumorilor.

O altă etapă importantă în fibrilogeneză, influenţată de vitamina C, este cea de maturare a fibrelor. Se susţine că acidul ascorbic ar exercita o influenţă în sensul măririi stabilităţii structurale a fibrilelor, efect datorat în primul rînd grupelor COH = COH şi radicalului acid ionizat. Punînd acidul ascorbic în contact cu soluţii de colagen, se constată formarea unor fibre mai rezistente la digestiile enzimatice şi la extracţiile chimice, decît cele formate în absenţa vitaminei C [193]. Creşterea stabilităţii structurale determinată de influenţa directă a acidului ascorbic este în mare măsură dependentă de stereospecificitatea substanţei administrate, acidul L-ascorbic avînd un efect mult mai net decît cel dehidro-L-ascorbic. O altă modalitate de influenţare a stabilităţii structurale a fibrelor ar fi prin intermediul formării unui ciment interfibrilar mucoproteic, care, conectat cu vitamina C, s-ar interpune între fibrilele colagene [223]. Capacitatea acidului ascorbic de a potenţa agregarea fibrilară a macromoleculelor de colagen trebuie să ne facă să fim foarte prudenţi în administrarea acestei substanţe cînd există pericolul formării unei fibroze difuze viscerale. S-a putut demonstra foarte net că la cobai, tioacetamida (30 mg/kg) produce o scleroză hepatică mult mai severă la animalele care au primit şi vitamină C (15 mg/kg)

Scanned with OKEN Scanner

decît la cele cărora li s-a administrat numai toxicul. Dacă cobaii erau ţinuţi la un regim lipsit de acid ascorbic, cu toată acţiunea toxicului, fibroza hepatică se dezvolta mult mai încet şi mai puţin intens, biochimic apărînd şi o cantitate foarte redusă de hidroxiprolină [994]. Tot atît de importante sînt şi observaţiile care notează că, în lipsa vitaminei C şi deci a unui factor de potenţare a sintezei colagenului, în granuloame apar zone de liză a fibrelor [403], producîndu-se un proces de depleţie, cu reutilizarea colagenului matur din variate organe şi ţesuturi [576].

Efectele exercitate de vitamina C asupra mucopolizaharidelor acide sînt puţin studiate. Deşi de multă vreme s-a atras atenţia că plăgile animalelor cu scorbut conţin o acumulare anormală de substanţă fundamentală, nici pînă astăzi nu s-a putut preciza dacă este vorba de o potenţare a sintezei de acid hialuronic, sau de un efect secundar stărilor de inhibiţie funcţională a tiroidei. Diminuarea cantităţii de mucopolizaharide acide sulfatate, constatată de asemenea în plăgile cobailor cu scorbut, a fost atribuită fie unei inhibiţii a sintezei datorită absenţei acidului ascorbic, fie stării de inaniţie în care se găseau animalele. Pe de altă parte, s-au notat şi variaţii puţin semnificative ale mucopolizaharidelor [571].

În comparaţie cu animalul necarenţat, granulomul experimental de la animalul scorbutic se caracterizează prin absenţa creşterii condroitin-sulfatului B şi prin lipsa diminuării cantităţii de acid hialuronic, o dată cu maturarea ţesutului conjunctiv. De aceea, în a 14-a zi de la apariţia granulomului, acesta conţine o cantitate de 6 ori mai mare de acid hialuronic, decît la animalul martor [571].

Un efect mai bine studiat al acidului ascorbic este cel legat de degradarea acidului hialuronic. Întrucît rezultate asemănătoare au mai fost obţinute cu ionii de metale grele şi cu peroxidul de hidrogen, s-a sugerat că mecanismul de acţiune ar necesita prezenţa unei grupări hidroxil, care „atacă" structura mucopolizaharidului. Alte studii implică un proces de oxido-reducere, convertind acidul ascorbic în acid dehidroascorbic. Nu s-a putut preciza dacă acţiunea degradantă are loc numai la nivelul legăturilor dintre macromoleculele de acid hialuronic, sau implică şi atacarea peptidelor care formează complexe cu aceste macromolecule. O altă ipoteză susţine că prin autooxidarea vitaminei C rezultă acidul dicetogulonic (produs al metabolismului intermediar al acidului ascorbic) care ar reprezenta substanţa activă în depolimerizarea acidului hialuronic [795]. În mod particular, acidul hialuronic din sinoviala bolnavilor cu artrită reumatoidă ar fi extrem de susceptibil la acest mecanism de degradare [4], acţiunea depolimerizantă fiind inhibată de proteinele serice, în special de globulina $alfa_2$ [858] ;mai recent s-a atras atenţia asupra efectului inhibant al ceruloplasminei [795]. De aceea, acţiunea depolimerizantă a acidului ascorbic asupra acidului hialuronic este cu atît mai redusă, cu cît în lichidul sinovial ceruloplasmina se găseşte în concentraţie mai mare [794].

O ultimă problemă, în legătură cu acţiunea vitaminei C asupra ţesutului conjunctiv, se referă la capacitatea organismului de a folosi

această substanţă. Datele experimentale publicate sugerează că această capacitate se modifică în cursul vieţii, scăzînd progresiv pe măsură ce organismul îmbătrîneşte. Pentru exemplificare, menţionăm rezultatele unei cercetări experimentale în care, utilizîndu-se acid ascorbic marcat, s-a putut constata că ţesutul conjunctiv din pielea şobolanului de 2 săptămîni încorporează avid vitamina C, în timp ce, la animalul de 2 ani, nu se mai poate detecta pătrunderea intracelulară a radioizotopului. În măduva osoasă, captarea a fost de 5 ori mai mare la animalul de 2 săptămîni, în comparaţie cu cel de 2 ani, apărînd cu claritate o reducere a încorporării şi în ficat, rinichi şi creier, o dată cu îmbătrînirea animalului [546].

Vitamina A

Efectul cel mai important al vitaminei A privind modificarea organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv este eliberarea lizozomilor din celulele cartilajului, rezultînd o depleţie a matricei, similară cu cea produsă de papaină [277]. Procesul de alterare a lizozomilor a fost evidenţiat şi în celulele din focarele de inflamaţie, rezultînd, după administrarea vitaminei A, o scădere a materialului metacromatic din substanţa fundamentală a granulomului inflamator şi o potenţare a activităţii colagenolitice a ţesutului respectiv [92]. La nivelul pielii, administrarea vitaminei A determină o creştere a fracţiei acidosolubile a colagenului, pe cînd papaina reduce această fracţie, ambele diminuînd în schimb fracţia neutrosolubilă. În ceea ce priveşte colagenul insolubil, nu pare să fie modificat, sugerînd că eliberarea enzimelor lizozomiale nu duce la apariţia de efecte colagenolitice importante la nivelul pielii [504,505]. În schimb, diminuă considerabil hexozaminele, mai ales datorită degradării acidului hialuronic şi condroitin-sulfaţilor din substanţa fundamentală [207]; de asemenea, scade cantitatea tisulară de glicoproteine. Un alt efect ar fi blocarea sintezei de mucopolizaharide sulfatate sau de glicoproteine sulfatate, prin inhibarea formării PAPS-ului. Acest efect variază ca intensitate de la un organ la altul, dar poate fi evidenţiat atît în ţesutul conjunctiv, cît şi în mucinele epiteliale [448].

Vitamina E

Influenţa vitaminei E asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv apare ca deosebit de interesantă întrucît este vorba de singura vitamină cunoscută pînă acum care produce o diminuare a rezistenţei fibrelor (sau, ceea ce noi am denumit : hipostabilizare structurală). Procesul a putut fi evidenţiat atît în aortă, cît şi în piele şi granuloame, exteriorizîndu-se prin : creşterea solubilităţii fibrelor, diminuarea rezistenţei lor la digestii enzimatice şi extracţii chimice, alterarea capacităţilor

Scanned with OKEN Scanner

de rezistenţă mecanică. La nivelul granulomului, acelaşi proces este reflectat şi de o acumulare anormală de colagen neutrosolubil, indicînd lipsa de maturare a macromoleculelor. Mecanismul de acţiune este însă puţin cunoscut, sugerîndu-se că ar fi similar cu cel al substanţelor latirogene [160, 161, 162].

AGENŢI ANTIINFLAMATORI

Salicilaţii

Deşi reprezintă agenţi terapeutici larg folosiţi în tratamentul reumatismului şi al altor boli care alterează organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv, mecanismul lor de acţiune este încă departe de a fi bine precizat. Efectul cel mai evident pare să fie blocarea încorporării de grupe sulfat în mucopolizaharide acide [1180]. Această diminuare a fost constatată, cu ajutorul radiosulfatului administrat parenteral, în cartilaj, cornee, valvule cardiace. S-a sugerat că, *in vivo*, salicilaţii, ca şi alte substanţe cu acţiune antiinflamatoare, ar fi ele însile sulfatate, intrînd astfel în competiţie, pentru acelaşi număr de grupe sulfat, cu monomerul mucopolizaharidelor acide. Procesul de inhibare a sintezei mucopolizaharidelor de către salicilaţi pare să fie însă mult mai complex, întrucît sînt blocate nu numai încorporarea în fibroblaşti sau condroblaşti a sulfatului activ, ci şi a glucozei marcate şi a unor produşi intermediari ai metabolismului mucopolizaharidic, inhibîndu-se, de exemplu, conversiunea fructozo-6-fosfatului în glucoză-6 fosfat [140]. Faptul că acidul salicilic poate chela ioni de cupru şi de fier, creiază condiţiile apariţiei unor concentraţii inadecvate a acestor ioni implicaţi în transformarea enzimatică a prolinei în hidroxiprolină, sau a lizinei în hidroxilizină. Compusul este cu atît mai activ, cu cît pare, la examenele fizico-chimice, mai hidrofobic, mai lipofilic şi mai apt să formeze complexe cu ionii metalici. *In vitro*, efectul de inhibare a sintezei mucopolizaharidelor apare cu doze similare celor utilizate *in vivo* în scopuri terapeutice [1179]. Un aspect particular de acţiune a salicilaţilor ar fi capacitatea de a inhiba depolimerizarea prin oxido-reducere a acidului hialuronic, acest proces fiind evident mai ales în cavitatea articulară, în cursul artritei reumatoide. Administrarea de salicilaţi diminuă creşterea anormală a permeabilităţii sinovialei, împiedicînd trecerea unui exces de proteine serice în lichidul sinovial. În acest sens, salicilaţii contracarează efectele de depolimerizare, exercitate de acidul ascorbic [477]. Acţiuni similare au fost constatate şi la nivelul pielii, creşterea permeabilităţii dermului ca urmare a depolimerizării prin oxido-reducere a acidului hialuronic, fiind inhibată prin acţiunea salicilaţilor [311].

În afara reducerii sintezei mucopolizaharidelor acide sulfatate şi măririi gradului de polimerizare a acidului hialuronic, salicilaţii modifică

Scanned with OKEN Scanner

organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv acţionînd şi asupra colagenului. Efectul general ar fi o scădere a stabilităţii structurale a fibrelor, reflectat de diminuarea temperaturii la care fibrele prezintă procesul de contracţie termică [1078]. În schimb, relaxarea după contracţie se produce mai repede decît normal, ceea ce constituie un argument în plus asupra alterărilor în stabilitatea structurală a fibrelor. Se pare că dintre toate substanţele cu acţiune antiinflamatoare studiate prin testul contracţiei termice a fragmentelor de tendon, salicilaţii ar exercita cea mai netă acţiune hipostabilizantă. S-a precizat că efectul hipostabilizant este caracteristic numai dozelor mari de salicilat, pe cînd cu doze mici se pot obţine efecte contrarii [5].

Acţiunea salicilaţilor asupra sintezei colagenului este reflectată prin creşterea cantităţii de colagen neutrosolubil şi mărirea eliminării urinare a hidroxiprolinei. În acelaşi timp, se produce o activare a degradării colagenului insolubil şi o reducere la jumătate a duratei metabolizării fiecărei macromolecule de colagen. Apare astfel, sub acţiunea unor doze de salicilat ce ar corespunde cu 21 g/70 kg greutate corporală la om, o intensificare a tuturor fazelor legate de metabolismul colagenului [1074]. La producerea acestui efect ar contribui şi capacitatea salicilaţilor de a mări captarea tisulară a oxigenului, efect legat de decuplarea fosforilării oxidative [1013]. Într-un mediu bogat în oxigen atît *in vitro* cît şi *in vivo*, sinteza şi degradarea colagenului apar net accelerate.

Aceste date sugerează utilizarea salicilaţilor în toate procesele unde este necesară o sinteză şi metabolizare rapidă a colagenului, de la variate tipuri de plăgi, la leziunile degenerative ale articulaţiilor [1074].

Fenilbutazona

Ca şi salicilaţii, fenilbutazona inhibă sinteza mucopolizaharidelor acide sulfatate, exercitînd, în plus, o acţiune de depolimerizare a acestor substanţe acumulate în plăgi şi în granuloame, acţiune ce a fost asemănată cu aceea a hialuronidazei [650]. Rezultă formarea de produşi dializabili ce trec în circulaţia sistemică şi în urină. Comparîndu-se, la nivelul unei plăgi experimentale, efectul inhibant asupra sintezei mucopolizaharidelor exercitat de glucocorticoizi şi de butazolidină, s-au obţinut următoarele date care se suprapun celor constatate la nivelul artritei experimentale prin formol [468, 469]: a) în faza exsudativă, acţiunea inhibantă a glucocorticoizilor este mai evidentă decît cea a butazolidinei, această diferenţă păstrîndu-se de-a lungul întregii perioade de proliferare a plăgii; b) în stadiul de plagă matură, cele două tipuri de acţiuni inhibante se egalizează; c) în stadiul de evoluţie cronică a artritei experimentale, acţiunea inhibantă a butazolidinei devine mult mai importantă decît cea a glucocorticoizilor.

Ca şi salicilaţii, fenilbutazona stimulează oxidarea a numeroase substrate tisulare, probabil prin absenţa cuplării fosforilării oxidative. În

Scanned with OKEN Scanner

mod special aceste efecte se exercită asupra adenozintrifosfatului; acțiunea este cu atît mai netă cu cît preparatul este mai puțin hidrosolubil și mai intens liposolubil. Această acțiune, bazată pe existența unui sistem conjugat alfaceto-enol ($CO-\overset{|}{C}=\overset{|}{C}-OH$), permite ca, la o concentrație de 10 mg%, fenilbutazona să stimuleze oxidarea piruvatului, succinatului, izocitratului, fumaratului și malatului de către mitocondriile celulelor conjunctive, iar în concentrații mari, să inhibe oxidarea acelorași substrate. Modul cum se trece de la efectul stimulator, la cel inhibant este încă nelămurit, dar, practic, are mare importanță să se știe cu ce doze trebuie să se intervină cînd este necesară micșorarea activității metabolice a celulelor, sau, dimpotrivă, potențarea ei.

Spre deosebire de salicilați, fenilbutazona nu influențează, *in vitro*, temperatura la care are loc contracția colagenului din tendon, sugerînd că nu ar exercita o influență importantă asupra stabilității structurale a fibrelor.

Sinteza colagenului ar fi diminuată sub acțiunea dozelor utilizate în terapeutică. Astfel, în granulomul experimental, după administrarea de butazolidină se constată o scădere cu aproximativ 20% a masei țesutului de neoformație (în comparație cu animalul netratat) și o reducere cu aproximativ 20% a mucopolizaharidelor și cu 40% a colagenului [87]. Aceste reduceri se însoțesc de efecte antiexsudative și antiproliferative, iar, pe linie celulară, de o importantă diminuare a energiei necesare dezvoltării țesutului de granulație [1078].

Fenilbutazona inhibă secreția de glicoproteine sulfatate în mucine, existînd probabil un raport direct între această acțiune și favorizarea apariției ulcerului gastric [619].

Antimalaricele de sinteză

Efectele clorochinei asupra mucopolizaharidelor par similare cu cele exercitate de salicilați și fenilbutazonă, antimalaricul de sinteză producînd o inhibare netă a încorporării radiosulfatului în cartilaj, valvule cardiace, cornee, piele etc. [1180]. Asupra stabilității structurale a fibrelor de colagen, acțiunea se situează pe o poziție intermediară între cea destabilizantă netă a salicilaților, și cea indiferentă, a fenilbutazonei. Studiul incubării cartilajului cu clorochină relevă o acțiune particulară a acestei substanțe. În absența clorochinei, la pH 5,0 și la 37°C în mediul de incubație apar atît hidroxiprolina, cît și produși rezultați din degradarea condromucoproteinei, sugerînd liberări spontane de enzime lizozomiale cu acțiuni colagenolitice, glicolitice și proteolitice. Dacă se adaugă clorochină, aceste reacții autolitice sînt inhibate în proporție de peste 50% [1181], sugerînd că antimalaricul de sinteză blochează acțiunea hidrolazelor acide lizozomiale. *In vitro* s-a constatat că clorochina inhibă și colagenaza bacteriană, dar este fără efect în blocarea acțiunii degradante a papainei și tripsinei asupra gelatinei, cazeinei și albuminei, sau

a hialuronidazei testiculare asupra cartilajului [1181]. Apare deci cu claritate că acţiunea antiinflamatoare a clorochinei este datorată, în parte, inhibării enzimelor glico- şi proteolitice lizozomiale şi în parte inhibării sintezei de mucopolizaharide acide sulfatate. De reţinut că efectele clorochinei asupra sintezei mucopolizaharidelor acide se exercită mai tardiv decît cele ale salicilaţilor şi fenilbutazonei, durează un timp mai îndelungat şi pot fi uneori ireversibile. În ceea ce priveşte influenţa directă asupra sintezei colagenului, se menţionează o diminuare a încorporării glicinei marcate în fracţia solubilă, nou sintetizată [927], sugerînd o diminuare a elaborării acestui tip de macromolecule.

Sărurile de aur

Efectul dominant al sărurilor de aur pare diferit de cel al salicilaţilor, fenilbutazonei şi antimalaricelor de sinteză, exercitîndu-se în special asupra stabilităţii structurale a fibrelor. *In vitro*, nu s-a constatat o interacţiune între tiosulfatul de aur şi fibra de colagen. *In vivo* însă, aceste interacţiuni apar foarte nete, ducînd la o considerabilă creştere a numărului de legături intermoleculare, cu apariţia unei hiperstabilităţi structurale de tipul celei implicate în procesele de îmbătrînire. Se crede că legarea iniţială a complexului format de către sărurile de aur s-ar efectua prin intermediul forţelor electropolare. În acest proces, grupările tiosulfat sînt îndepărtate prin distrucţie oxidativă, iar ionul de aur introduce legături coordinative între lanţurile polipeptidice ale colagenului [7,8]. Acelaşi rezultat poate fi obţinut prin oxidarea cu H_2O_2 a tiosulfatului. Fibra de colagen supusă acţiunii sărurilor de aur are o temperatură de contracţie mai ridicată, este mai deshidratată şi devine mai rezistentă la extracţiile chimice, toate aceste modificări reflectînd creşterea legăturilor intermoleculare. În acelaşi sens pledează şi efectele antilatirogene, obţinute prin administrarea de săruri de aur la animalele tratate cu beta-aminoproprionitril [6].

AGENŢI VARIA

Acest subcapitol include efectul unor substanţe care, în mod întîmplător, au fost descoperite ca avînd acţiuni importante asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv. Exemplele ce vor fi date pot sugera cît de largă este sfera acestor substanţe şi cît de limitate sînt încă cunoştiinţele noastre în acest domeniu.

Scanned with OKEN Scanner

Penicilamina

Din studiul acțiunii diferiților agenți chelatori, a reieșit că *penicilamina* (beta-beta-dimetil-cisteina) exercită un efect cu totul particular asupra metabolismului colagenului. Administrată la animale de experiență, determină o mare acumulare de colagen neutrosolubil în piele, modificare însoțită și de diminuarea rezistenței mecanice a fibrelor de colagen și de scăderea capacității de vindecare a plăgilor [796]. Analiza modului de acțiune a penicilaminei a demonstrat că izotopul este normal încorporat în fibroblaști, condroblaști sau osteoblaști, dar nu apar fibre noi de colagen din acest proces de sinteză, indicînd o absență a agregării colagenului solubil, în complexe insolubile. Mai mult decît atît, colagenul insolubil nou format, pus în prezența penicilaminei, suferă rapid un proces de degradare. Modificările legate de potențarea turnoverului colagenului apar cu atît mai nete, cu cît animalul este mai tînăr. Analize biochimice au arătat că din cauza turnoverului rapid, macromolecula nu mai apare cu structura complexă, ci doar sub aspectul unirii monomerilor alfa, în timp ce dimerii beta și trimerii gamma nu se mai formează. Aceste date biochimice, constatate pe material recoltat *in vivo*, au fost confirmate și pe modele *in vitro* : dacă se izolează fracția acidosolubilă a colagenului și se pune în contact cu penicilamina, raportul monomeri alfa/dimeri beta se modifică rapid, în favoarea monomerilor. Din studiul contracției termice a reieșit că, după un tratament cu penicilamină, colagenul din fibrele de tendon și piele pierde total capacitatea de contracție termică, ceea ce indică absența legăturilor intermoleculare. Dacă însă se introduc artificial aceste legături, contracția apare. De asemenea, dacă plăgile care nu se vindecau, la animalele tratate cu penicilamină, erau spălate cu formol (care introduce legături intermoleculare artificiale), cicatrizarea începea să se contureze [1208]. Reamintim că agenții latirogeni, deși împiedică formarea de legături intermoleculare, nu fac să dispară contracția termică a fibrelor, ci doar îi prelungesc timpul de relaxare ; de asemenea, nu au nici o influență asupra gradului de stabilitate structurală a colagenului insolubil. De aceea, penicilamina are un mod de acțiune cu totul particular asupra colagenului, în ipoteticul său mecanism de acțiune fiind incriminate ruperi ale legăturilor de tipul bazelor Schiff, prin atacul exercitat de grupul mercapto al penicilaminei, la carbonul imino al bazei Schiff [105]. Un alt mecanism incriminat ar fi deficiența de cupru, rezultată din chelarea cuprului de către penicilamină [1208].

Actinomicina D

Actinomicina D influențează metabolismul colagenului reducînd sinteza, de exemplu în cartilaj, cu aproximativ 40 % [719]. Această substanță ar acționa prin blocarea producerii acidului ribonucleic mesager în fibroblaști, condroblaști și osteoblaști [96]. Faptul că sinteza altor tipuri de pro-

Scanned with OKEN Scanner

teine este complet inhibată, iar cea de colagen doar parțial diminuată, sugerează că ar exista, în celulele mezenchimale, tipuri variate de acizi ribonucleici mesageri, cel implicat în sinteza colagenului fiind mai stabil decît cei implicați în sinteza proteinelor necolagene.

Dintre substanțele cu efect antimitotic, utilizate ca citostatice, diacetilcolchicina (*Citostalul*) s-a dovedit capabilă să producă o scădere importantă a fracției neutrosolubile a colagenului și o creștere a celei acidosolubile și insolubile. Efecte similare au fost obținute cu 5-fluorouracilul. Caracteristic pentru aceste substanțe este rapida agregare fibrilară a colagenului, cu predominanța fracției insolubile, dar tot atît de rapida dezagregare ulterioară a acestor fibrile. Aceste date au sugerat că efectul final al acțiunii citostaticelor este tot lipsa de maturare a colagenului [322].

Histamina

În cursul ultimilor ani s-au strîns date tot mai numeroase care atestă rolul de *growth and repair hormone*, atribuit histaminei. Cercetările noastre efectuate cu mai mult de un deceniu în urmă, au atras atenția asupra capacității acestei substanțe de a potența sinteza locală de mucopolizaharide, transformarea macrofagelor în celule apte să elaboreze și să metabolizeze mucopolizaharide, precum și efectul stimulator exercitat asupra fibrilogenezei colagene [678, 679, 681, 682, 1114]. Investigații ulterioare au demonstrat că dezvoltarea țesutului conjunctiv, atît la embrion, cît și în plăgile pe cale de cicatrizare, poate fi corelată cu rapiditatea apariției locale a histaminei, la rîndul ei subordonată activității histidincarboxilazei. S-a ajuns chiar la concluzii susținînd că o parte esențială a mecanismului de creștere a țesutului conjunctiv, mai ales cel de reparație, este bazat pe capacitatea locală de formare a histaminei. Astfel, în prezența unei sinteze adecvate de histamină, un granulom experimental conține cu aproximativ 55% mai mult colagen decît granulomul nestimulat de histamină [934]. Un alt aspect particular al acțiunii histaminei pare să fie inhibiția sintezei de mucopolizaharide acide sulfatate la nivelul aortei [569], experimental, administrarea prelungită a acestei substanțe favorizînd dezvoltarea aterosclerozei [872].

Fierul

S-a menționat importanța ionilor feroși pentru sinteza colagenului, prezența lor părînd indispensabilă în transformarea prolinei în hidroxiprolină. La aceste date analitice se pot adăuga observații histopatologice extrem de numeroase, care menționează apariția de fibroze acolo unde se găsesc și acumulări de fier în țesuturi. Experimental, administrarea de fier coloidal grăbește dezvoltarea cirozei hepatice prin tetraclorură de

Scanned with OKEN Scanner

carbon [567]; dimpotrivă, s-au notat scăderi importante ale capacității de sinteză a colagenului, în cursul anemiilor sideropenice; tot la animalele cu anemie sideropenică, plăgile prezintă un grad mai lent de vindecare, apărînd un ritm extrem de redus de sinteză a colagenului [215]. Astfel se strîng date preliminare din care rezultă importanța fierului în păstrarea unei organizări macromoleculare normale a țesutului conjunctiv și influența pe care agenții chelatori, sustrăgînd acest fier, o pot exercita indirect asupra sintezei și metabolismului colagenului.

Heparina

Heparina reprezintă prima macromoleculă constitutivă a țesutului conjunctiv care a căpătat o largă utilizare terapeutică, deschizînd o eră nouă în tratamentul trombozelor și al emboliilor. Eficacitatea sa în aceste procese patologice a fost comparată cu aceea a insulinei în diabet, fiind, încă, după treizeci de ani de la introducerea în terapeutică, cel mai puternic agent anticoagulant. De aceea vom insista mai mult asupra efectelor acestei substanțe, întrucît ele se exercită în parte și în condiții fiziologice, reflectîndu-se în primul rînd prin inhibarea elaborării tromboplastinei și a transformării protrombinei în trombină. Rolul heparinei pare deci important mai ales în cursul primei faze a coagulării sanguine, în procesul de formare a trombinei și în interacțiunea trombină-fibrinogen, necesară apariției fibrinei. Este interesant de menționat că inactivarea trombinei nu rezultă dintr-o degradare enzimatică, ci din blocarea zonelor cu activitate catalitică din molecula de trombină [871]. Așa se explică de ce efectul este atît de total deblocat de substanțe antagoniste heparinei, de tipul protaminei, care acționează ca un puternic polielectrolit cu sarcini electrice pozitive. De altfel, forțele electropolare joacă rol dominant și în formarea tromboplastinei plasmatice și a celei tisulare. De aceea, coagularea poate fi prevenită mărindu-se numărul de sarcini negative libere, spre a se favoriza astfel repulsia intermoleculară.

În afara acțiunii asupra coagulării sîngelui, grație acelorași sarcini electrice negative libere purtate de grupele sulfat și, secundar, de radicalii carboxilici, heparina leagă rapid proteine cu grupe amino libere, constituind astfel complexe cu histamina, serotonina etc. Prin același mecanism poate interveni în reacțiile antigen-anticorp, în permeabilitatea tisulară și capilară, în procesele alergice și inflamatoare, în creșterea și diferențierea celulelor conjunctive; în sfîrșit, prin legăturile electropolare heparina poate inactiva numeroase enzime, toxine, venin uri, virusuri și chiar antibiotice.

Acțiunea anticoagulantă a heparinei se exercită și asupra protoplasmei celulelor conjunctive și, probabil, și a multor elemente parenchimatoase, unde acționează ca un agent de reglare a gradului de coagulare a gelului protoplasmatic. Ea ar influența intracelular și procesul de diviziune, avînd un efect „destabilizant" asupra proteinelor nucleare, tot

prin intermediul modificărilor sol-gel [241]. Heparina mai exercită un efect stimulator asupra apariţiei pseudopodelor, probabil ca urmare a depolarizării membranei celulare. Efectul de depolarizare este interesant de studiat, în legătură cu formarea primelor aglomerări fibrilare ale macromoleculelor de colagen, aglomerări care au loc probabil pe suprafaţa membranei celulare şi sînt condiţionate de efecte de polarizare. În focarele inflamatoare capacitatea heparinei de a influenţa polarizarea membranelor se reflectă în gradul de motilitate a celulelor de infiltraţie, în special a granulocitelor neutrofile. Apariţia, în aceste focare, de proteine bazice, cum ar fi cele din exsudate, diminuă motilitatea celulară, ca urmare a neutralizării sarcinilor electrice negative ale heparinei [99]. Heparina stimulează procesele de fagocitoză şi exercită o acţiune netă de stimulare a pinocitozei, precum şi de control al activităţii enzimelor lizozomiale [287]. Toate aceste date sugerează modul complex în care acest mucopolizaharid influienţează activitatea metabolică a ţesutului conjunctiv.

Ca acţiuni complimentare, menţionăm inhibarea lipidogenezei, reducerea nivelului lipemiei, diminuarea efectelor degradante ale hialuronidazelor, blocarea parţială a acţiunii cortizonului şi histaminei asupra ţesutului conjunctiv, stimularea formării lipoprotein-lipazei. Repetăm, însă, că multe dintre aceste acţiuni trebuiesc corelate cu condiţiile experimentale şi doza utilizată. Astfel, deşi se admite în general că heparina inhibă activitatea enzimelor ce degradează ţesutul conjunctiv, s-a putut demonstra că osteoporoza heparinică ar rezulta din activarea colagenazelor prezente în lizozomii celulelor osoase [37]. De asemenea, s-au menţionat acţiuni stimulatoare ale heparinei asupra ribonucleazei şi beta-glucuronidazei [644]. În cercetările noastre [1121, 1131], am descris efectul inflamator exercitat asupra ţesutului conjunctiv pulmonar de anumite doze de heparină instilate intratraheal, în timp ce în numeroase lucrări s-au notat efecte antiinflamatoare. De altfel problema dozei apare şi din analiza complicaţiilor terapeutice. Astfel, după tratamente prelungite (2—16 ani) în scopul profilaxiei aterosclerozei, cu cantităţi ce nu depăşeau 100 mg heparină pe zi, nu s-au notat modificări osoase decelabile radiologic. Dacă însă doza a fost de 200—300 mg pe zi, 5 din 9 pacienţi au prezentat osteoporoză, mergînd pînă la fracturi vertebrale multiple. De remarcat că nivelul sanguin al calciului şi fosforului, eliminarea lor renală, ca şi cantitatea de hidroxiprolină din urină nu au ieşit din limitele convenţional stabilite ca fiziologice [792]. De asemenea, nu s-au putut detecta disfuncţii ale paratiroidelor, iar la nivelul osului, captarea de oxigen şi producţia de lactat au apărut normale. De aceea, concluziile acestor observaţii au sugerat că heparina ar activa eliberarea unor enzime cu potenţialităţi colagenolitice, prezente în lizozomii celulelor osoase, prin efect direct asupra membranelor lizozomiale. Un alt mecanism implicat ar fi inhibarea procesului de formare a osului, atît prin reducerea sintezei matricei, cît şi a ratei de mineralizare [959]. Drept urmare, în fracturile experimentale,

Scanned with OKEN Scanner

formarea calusului a apărut întîrziată sub tratament heparinic. Modul de acţiune este greu de precizat, acceptîndu-se pentru moment ipoteza inhibării ribonucleazelor, din care rezultă o deficienţă în sinteza colagenului şi a proteinelor necolagene din matricea osoasă. Diminuarea activităţii fosfatazei alcaline ar putea ajuta la explicarea întîrzierilor în procesul de mineralizare a matricei neoformate.

Datele prezentate sugerează că, ori de cîte ori sînt recomandate cure prelungite cu heparină, cu scopul tratării infarctului de miocard, aterosclerozei, afecţiunilor cardiace şi vasculare ce necesită intervenţii chirurgicale, trombozelor venoase, sindroamelor postflebitice, emboliilor grăsoase, arsurilor, hemoglobinuriilor paroxistice, stărilor de hipersensibilitate, reumatismului, dermatozelor, hipertensiunii arteriale, nefritelor etc. este profund influenţată organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv în general.

Acidul hialuronic şi condroitin-sulfaţii

Aplicarea acidului hialuronic pe plăgile atone a fost urmată de o activare a procesului de reparaţie tisulară. Efecte similare s-au obţinut cu extracte de ţesut conjunctiv embrionar, extrem de bogat în acid hialuronic. În afara regenerării tisulare, mucopolizaharidul ar mai stimula diferenţierea celulară şi tisulară, sinteza proteinelor şi procesele de înmagazinare intracelulară a produşilor rezultaţi din dezagregări, lize sau acumulări de macromolecule [246]. În ganglionii limfatici s-a constatat o diferenţiere accelerată a elementelor limforeticulare, limfoplasmocitare şi limfohistiocitare, proces reflectînd o hiperactivitate generală a sistemului reticuloendotelial. *In vitro*, cu anumite doze de acid hialuronic s-au obţinut neoformări de matrice cartilaginoasă şi transformarea sa în ţesut osteoid [76]. Nu s-au semnalat însă rezultate net favorabile în vindecarea fracturilor [164]. La nivelul ţesutului de granulaţie, administrarea locală de acid hialuronic stimulează neoformarea capilară [245]. Procesul de neoformare capilară a fost menţionat şi de noi în parenchimul respirator, după instilaţia intratraheală de acid hialuronic [1121, 1131].

Efecte mai favorabile din punct de vedere terapeutic au fost obţinute cu condroitin-sulfaţi sau cu pulbere de cartilaj, incluzînd o mare cantitate a acestor mucopolizaharide. Astfel, după tratare locală a plăgilor cu pudră de cartilaj s-a constatat o scurtare a timpului de vindecare, rezultatul fiind cu atît mai net, cu cît cartilajul era mai tînăr şi pudra cu granule de dimensiuni mai mici [883]. Efecte mulţumitoare s-au notat şi la nivelul fracturilor deschise, focarelor de osteomielită, plăgilor atone şi arsurilor [558], în toate aceste tipuri de leziuni producîndu-se o stimulare a fibrilogenezei şi a regenerării tisulare în general. Experimental, la ni-

Scanned with OKEN Scanner

velul unei leziuni necrotice a pielii, administrarea pudrei de cartilaj a determinat apariţia procesului de vindecare în numai 15 zile, în comparaţie cu 23 de zile la animalele netratate. Determinările biochimice au evidenţiat că administrarea acestei pudre împiedică scăderea valorilor colagenului şi creşterea valorilor hexozaminelor, constatate la lotul netratat [501]. În plus, fracţii conţinînd condroitin-sulfaţi cu o greutate moleculară de 4 000, măresc cu aproximativ 22% faţă de animalul martor, capacitatea de contracţie a plăgilor [1049]. Nu s-au constatat efecte secundare sau de fagocitoză ale pudrei, sugerîndu-se că aceasta ar acţiona exclusiv prin proprietăţile biochimice ale condroitin-sulfaţilor [1199]. La nivelul osului, pudra de cartilaj este eficientă în grăbirea mineralizării matricelor osifiabile, accelerînd în mod evident şi ritmul de vindecare a plăgilor [767].

În afară de acidul hialuronic şi de condroitin-sulfaţi, au mai fost întrebuinţaţi în terapeutică şi alţi polimeri glucidici sau mucoprotidici, dar din lipsa unor rezultate concludente nu mai insistăm asupra acestui subiect. Menţionăm numai concluziile unei lucrări care, testînd acţiunea variaţilor polimeri glucidici asupra ţesutului conjunctiv, ajunge la concluzia că pentru a stimula regenerarea acestui ţesut, ca şi procesele de reparaţie, substanţele respective trebuie să posede: galactoză, ca cea mai importantă fracţie hexozică; legături 1-3, sau alternante 1-3 şi 1-4; un carbon 6 nesubstituit şi, facultativ, grupări sulfat [720].

IRADIAŢII

Frecvenţa cu care numeroşi pacienţi sînt iradiaţi, zilnic, în scop preventiv, diagnostic sau curativ, impune o adîncă înţelegere a modului în care razele X, ca şi cele ultraviolete, acţionează asupra organizării macromoleculare a ţesutului conjunctiv.

Acest mod de acţiune prezintă două particularităţi care nu trebuiesc niciodată uitate, şi anume:

1) existenţa unei disproporţii între cantitatea infimă de energie absorbită şi complexitatea alterărilor tisulare;

2) timpul de latenţă, uneori foarte mare, între momentul iradierii şi apariţia modificărilor în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv.

Efectele iradiaţiilor se exercită concomitent asupra celulelor, substanţei fundamentale şi fibrelor. Nu vom insista asupra modificărilor celulare întrucît este vorba de un vast subiect de biologie generală şi de radiobiologie, incluzînd toată problema modificărilor moleculare ale ADN-ului şi a urmărilor acestor modificări asupra capacităţii funcţionale a celulelor. În consecinţă, vom limita expunerea noastră asupra efectelor iradiaţiilor la nivelul componentelor extracelulare ale ţesutului conjunctiv.

Scanned with OKEN Scanner

Colagenul și elastina

Două procese distincte sînt de luat în considerație în *acțiunea razelor X* asupra fibrelor conjunctive :

a) o acțiune directă, în urma căreia macromolecula de colagen, de elastină sau de mucopolizaharid devine ionizată sau „excitată", o dată cu trecerea electronilor prin ea ;

b) o acțiune indirectă, în cadrul căreia macromolecula din țesutul conjunctiv primește energie prin transfer de la procesul de radioliză a apei :

$$H_2 + H\cdot + OH\cdot \rightarrow H_2O_2 + H_2$$

Acest ultim proces este mai bine cunoscut și general admis, întrucît există numeroase dovezi că, dacă o soluție este iradiată, efectul principal se reflectă în disocierea solventului în unități cu radicali liberi, care apoi „atacă" substanța dizolvată. În cazul soluțiilor de colagen, radicalii liberi OH^-, rezultînd din radioliza apei, ar capta H^+ din punțile de hidrogen inter- și intramoleculare, iar grupele astfel demascate ar constitui locuri de formare a unor legături încrucișate covalente. În scopul prevenirii formării de legături stabile la locurile descoperite prin procesul de radioliză a apei, se recomandă administrarea de substanțe conținînd radicali liberi, care să acționeze competitiv cu radicalii rezultați din dezagregarea apei, lăsînd astfel intacte macromoleculele dizolvate în soluție. În acest sens se menționează rezultate mulțumitoare obținute după tratamente preventive cu cisteină, glutation și cu alte substanțe ce activează enzime conținînd grupe SH, toate aceste mijloace terapeutice fiind eficiente dacă sînt administrate în momentul iradiației și nu consecutiv ei.

Plecîndu-se de la aceste constatări, putem încerca să explicăm diferențele de rezultate obținute prin iradierea colagenului, în absența și în prezența apei. Dacă fascicolul de electroni întîlnește fibra deshidratată, exercită o acțiune degradantă directă asupra fiecărei macromolecule în parte și colagenul își pierde în mare măsură proprietățile fizico-chimice și mecanice ; dacă fascicolul de electroni acționează asupra unei fibre în mediu apos, ca rezultantă a iradierii, apare un proces invers, de mărire a rezistenței mecanice a fibrelor. S-a putut determina susceptibilitatea fibrei uscate la iradiații, care este de aproximativ 5 ori mai mare decît a celei umede ; această diferență poate să dispară dacă fibra uscată este pretratată cu formol, introducîndu-se legături încrucișate supranumerare [156]. Alte investigații menționează că fibrele din tendon sînt degradate de iradiațiile cu raze X în proporție de 95 %, dacă există un conținut de 5% apă, și în proporție de numai 5%, dacă apa crește la 90% [154, 155]. Iradierea în prezența apei determină o creștere a insolubilității colagenului, proporțională cu intensitatea fluxului electronic ; acest efect este cu atît mai net, cu cît colagenul respectiv a avut inițial un număr mai redus de legături intermoleculare [862].

Scanned with OKEN Scanner

Modificările în organizarea macromoleculară a fibrelor de colagen sub acţiunea iradiaţiilor se pot evidenţia şi în dinamica comportării funcţionale a acestor fibre. Cu două decenii în urmă s-a menţionat că, *in vitro*, tendonul iradiat cu 20 Mrad se scurtează mai repede la căldură şi se rupe mai uşor la tracţiune, în comparaţie cu cel neiradiat [842]. Analiza modificărilor apărute în cursul contracţiei termice a evidenţiat că sub acţiunea a 5 Mrad, temperatura de contracţie scade de la 61° la 47°C, după 20 Mrad se reduce la 33°C, iar după 40 Mrad, la 27°C [47]. În acelaşi timp gradul de contractilitate a fibrei se măreşte de la 6% la 70%.

Pentru interpretarea rezultatelor apare de o importanţă deosebită doza utilizată, existînd o zonă limită pentru efectele distructive şi pentru cele hiperstabilizante. Astfel, s-a constatat că la doze de 10^4—10^5 rad, razele X acţionează ca agenţi de multiplicare a legăturilor încrucişate, iar la doze ce depăşesc 10^7 rad, predomină efectele distructive [1040]. Asupra colagenului acidosolubil dozele slabe acţionează în sensul măririi vîscozităţii soluţiei, iar dacă intensitatea dozajului creşte, soluţia devine din ce în ce mai vîscoasă pînă la o doză critică de 2×10^5 rad. Peste această doză, vîscozitatea se măreşte în continuare, dar apar, în plus, produşi de degradare cu greutate moleculară redusă [554]. În alte cercetări, la 90 000 r se notează alterări simple de vîscozitate, iar la 120 000 r modificări în rotaţia optică. De remarcat că aceleaşi alterări pot fi obţinute asupra ADN-ului cu numai 8 000 r [1175], sugerînd rezistenţa mult mai mare, întîlnită la ruperea legăturilor intermoleculare dintre unităţile constitutive ale fibrelor de colagen. În afara modificărilor de vîscozitate şi de rotaţie optică, s-au mai descris alterări ale paternului de difracţie la raze X, ale birefringenţei la lumină polarizată, toate indicînd modificări structurale în organizarea spaţială a macromoleculei de colagen. Apar, de asemenea, variaţii ale paternului de aminoacizi, cea mai mare sensibilitate la raze X prezentînd-o aminoacizii bazici şi acizii aspartic şi glutamic [155], aceşti aminoacizi polari fiind primii care se distrug, atît în cursul iradierii uscate cît şi a celei umede. Hidroxiprolina, aminoacidul cel mai important în asigurarea stabilităţii structurale a triplului helix al macromoleculei de colagen, nu a prezentat modificări cantitative în funcţie de doza de iradiaţie şi de fracţia colagenului în care a fost investigată [261]. O altă observaţie interesantă este incapacitatea macromoleculei de colagen, alterată prin raze X, de a reveni la structura iniţială, aşa cum revine după alterarea termică. Cercetările de difractometrie menţionează dispariţia gradului de cristalinitate cînd se ajunge la doza de 50 Mrad; macromolecula devine amorfă, dispoziţia în triplul helix fiind înlocuită cu o orientare întîmplătoare a lanţurilor polipeptidice [588]. Modul cum acţionează razele X pentru a produce alterările macromoleculei de colagen este un subiect de continuă preocupare. S-a menţionat că la o doză de 2,5 Mrad se pot distruge pînă la 100 de legături de hidrogen în fiecare macromoleculă, ceea ce reprezintă aproximativ 10% din cantitatea totală [862]. Se insistă şi asupra caracterului „transversal" al secţionării macromoleculei de colagen prin iradiaţii, ducînd la distrugerea zonelor amorfe situat la periferie şi la păstrarea nucleului central cu aminoacizi apolari. Din cauza

Scanned with OKEN Scanner

distrugerii zonelor periferice, bogate în aminoacizi polari, macromoleculele de colagen pierd capacitatea de reagregare fibrilară şi trec în stare amorfă, sub formă de compuşi cu greutate moleculară mică, în parte dializabili. Eliberarea dimerilor conţinînd lanţurile polipeptidice $alfa_1$ şi $alfa_2$ poate fi demonstrată prin ultracentrifugarea produsului de iradiaţie[261]. Intensitatea alterărilor depinde de doza utilizată şi de starea în care se găseşte fibra iradiată.

După cum am mai menţionat, faptul că la ADN apar modificări de vîscozitate după 8 000 r iar la colagen sînt necesare 90 000 r pentru alterări similare, ar sugera că distrugerea legăturilor dintre macromoleculele de colagen necesită o acţiune mult mai energică şi mai complexă a razelor gamma, în comparaţie cu acidul dezoxiribonucleic [1175]. În plus, la colagen, refacerea conexiunilor rupte apare mult mai repede şi mai stabil decît la ADN, fie prin rearanjarea fragmentelor moleculare ce se leagă prin noi punţi de hidrogen, fie prin formarea de legături covalente, atunci cînd mai rămîn rezidii aromatice de tipul tirozinei şi fenilanalinei [411]. Această ultimă ipoteză pare să fie argumentată de unele observaţii care sugerează creşterea zonelor ocupate de aminoacizii polari şi a densităţii electronomicroscopice a zonelor respective [45].

Diversitatea modelelor experimentale şi a materialului folosit, tinde să aducă mereu noi dovezi privind modul de acţiune a razelor X asupra colagenului şi nu permite să se degaje încă unele concluzii de ordin general. Experienţa clinică ne prilejuieşte să constatăm extrem de frecvent că după doze mici de iradiaţii se pot obţine degradări ale fibrelor de colagen din aderenţe, cicatrici vicioase sau granuloame inflamatoare, iar după doze mari se creiază condiţiile apariţiei sclerozelor difuze postradioterapice. Un exemplu al efectelor însumate în timp ale unor iradiaţii considerate de multe ori „inofensive", îl constituie radiodermita profesională. Biopsiile de piele au evidenţiat, la cazurile examinate, o scădere semnificativă a colagenului dermic din zonele lezate, în comparaţie cu zonele aparent normale. Analiza fracţiilor constitutive a indicat diminuarea, în special a celei insolubile şi, apoi, a celei acidosolubile. Dimpotrivă, fracţia neutrosolubilă a colagenului a fost găsită cu valori mai mari decît în pielea normală. Scăderea colagenului insolubil, ce poate reprezenta pînă la 90% din colagenul total al dermului de adult, era în concordanţă cu aspectul clinic de atrofie a pielei [777]. Ca mecanism patogenic s-a sugerat inhibarea agregării fibrilare, reflectată de creşterea cantităţii fracţiei neutrosolubile şi absenţa înlocuirii fracţiei insolubile, în concordanţă cu ritmul fiziologic de degradare [777]. La radiologi pot apare, după un număr de ani de iradiere profesională, şi plăci fibroase ale dermului, indicînd atît o mărire a capacităţii de sinteză a colagenului, cît şi o mărire a capacităţii de agregare fibrilară sub formă de fracţie insolubilă. Aceste aspecte au fost comparate cu cele obţinute prin iradierile tendonului în stare umedă, cînd se produc, consecutiv procesului de radioliză a apei, înmulţiri progresive ale numărului de legături intermoleculare. Faptul că semnele clinice de fibroză prin iradiaţie au fost ameliorate după tratare cu dimetilsulfoxid (10 g pe zi, timp de 3—4 luni), rezultînd şi o scădere chimic detectabilă a

Scanned with OKEN Scanner

colagenului din derm și o creștere a eliminării urinare a hidroxiprolinei, sugerează importanța acțiunii radicalilor liberi în inhibarea producerii acestui tip de fibroză [167].

În afara degradării fibrelor de colagen, razele X degradează și fibrele elastice. Aceste alterări au fost constatate atît în circulația sistemică, cît și în cea pulmonară, mai ales după doze ce depășesc 2 500 r [1053]. În special dozele între 1 500 și 2 500 r produc leziuni vasculare, comparate cu stadiile inițiale de dezvoltare a aterosclerozei [653]. Faptul că la doze între 3 000 și 5 500 r degradarea fibrelor elastice din peretele arterelor nu este însoțită de procese reparatoare, sugerează limita pînă la care aceste doze stimulează dezvoltarea acestor procese. Aspecte similare pot fi constatate și la nivelul venelor, după iradiații totale, apărînd cu claritate că numai sub influența dozelor mici organismul este capabil să sintetizeze colagen și alte macromolecule necesare țesutului de reparație care va înlocui fibrele elastice degenerate [1016]. Aceste date vin în sprijinul unor rezultate experimentale care arată că o anumită cantitate de raze gamma reprezintă limita de la care stimularea transformării prolinei în hidroxiprolină încetează, apărînd inhibiția aceluiași proces [587]. Concluzii asemănătoare pot fi trase și din studiul influienței razelor X asupra dezvoltării granuloamelor, cînd se pot obține reduceri pînă la aproximativ 50 % ale sintezei de colagen, în primele două săptămîni de dezvoltare a granulomului [798].

Acțiunea razelor ultraviolete asupra fibrelor de colagen și de elastină este deosebit de interesantă de studiat, dată fiind constanța cu care „îmbătrînește" pielea expusă mult la soare. Cercetările efectuate în acest domeniu au evidențiat o scădere a cantității de colagen, afectînd în special fracția insolubilă [152]. Expunerile de scurtă durată la raze ultraviolete favorizează creșterea numărului de legături intermoleculare, mărind stabilitatea structurală a fibrelor de colagen și pragul de contracție termică ; dimpotrivă, iradiațiile pe perioade lungi duc la degradarea fibrelor în produși dializabili, cu reducerea cantității totale de colagen [232]. Creșterea numărului legăturilor intermoleculare, sub acțiunea razelor ultraviolete ar fi datorită modificărilor care apar în grăsimile nesaturate. Aceste substanțe, sub acțiunea iradiațiilor, ar da naștere la produși de oxidare ce ar acționa ca agenți de formare a legăturilor încrucișate. Expunerea directă a unui film de gelatină la raze ultraviolete sau la lumina solară este urmată de modificări neînsemnate ale stabilității structurale a macromoleculelor de colagen. Dacă însă se întinde asupra filmului un strat de grăsimi nesaturate, numărul de legături dintre macromoleculele de colagen crește considerabil [132]. Înlocuind grăsimile nesaturate cu lipide neutre, procesul de interconectare suplimentară nu mai are loc. Se sugerează două mecanisme prin intermediul cărora grăsimile nesaturate „taninizează" *in vivo*, colagenul din piele : a) formarea de legături între acroleină și aldehide, pe de o parte, și grupele bazice ale colagenului, pe de altă parte ; b) formarea de legături între peroxizii acizilor grași și grupele neionice ale colagenului [133]. Este de reținut și ipoteza că agenții de interconectare o dată formați, nu rămîn permanent între grupele reactive ale celor două lanțuri polipeptidice, pe care le unesc printr-o legătură transversală ; după un anumit

interval de timp, prin acțiuni competitive sau prin alte mecanisme, ei părăsesc puntea de legătură creind posibilitatea ca lanțurile polipeptidice alăturate să se unească direct, prin legături covalente stabile. Lipidul nesaturat se interpune apoi între alte două lanțuri proteice, creind din nou condițiile ca ele să se unească direct și, astfel, un număr redus de agenți interconectanți determină o „taninizare" masivă a unui mare număr de fibre de colagen. Acest proces a fost inhibat experimental prin administrare de vitamina A, ceea ce ar sugera că la baza lui este efectul oxidant al razelor ultraviolete [132]. Fibrele de colagen supuse acțiunii în timp a grăsimilor nesaturate, devin extrem de rezistente la tracțiuni mecanice, se deshidratează și își reduc extensibilitatea, prezentînd modificări foarte asemănătoare cu cele caracteristice senescenței [153]. Un aspect particular al efectelor razelor ultraviolete asupra colagenului din piele ar fi așa zisa fotopolimerizare, determinată de modificările tirozinei și fenilalaninei din zona necristalină a macromoleculei. Prin alterările chimice ale acestor aminoacizi, macromolecula ar pierde o parte importantă a capacității sale de a agrega în fibrile, rămînînd aptă să formeze doar SLS (*segment long spacing*). Astfel se sugerează că zonele terminale ale macromoleculei ar reprezenta teritoriile cele mai sensibile la iradiația cu ultraviolete, în timp ce zonele cristaline par a fi mai puțin modificate [352, 353]. În zonele periferice bogate în aminoacizi aromatici, procesele de fotoliză și fotooxidare duc la creșterea numărului de radicali liberi [1054], sau chiar la dispariția totală a aminoacizilor de tipul tirozinei și fenilalaninei, apărînd o moleculă amputată, cu o stabilitate structurală modificată [234]. Rezultă macromolecule cu diametre mici, inadecvate precipitării fibrilare, degradate treptat și eliminate prin circulația sistemică.

Substanța fundamentală

Razele X influențează capacitatea celulelor de a sintetiza mucopolizaharidele acide, gradul de polimerizare a macromoleculelor eliminate în spațiile extracelulare, precum și fermitatea legăturilor lor cu proteinele. De o deosebită importanță ni se par în special efectele de convertire a normostabilității, în hipostabilitate structurală. Astfel de efecte apar, de exemplu, dacă mastocitele sînt brusc degranulate, sub acțiunea fluxului electronic. De asemenea, dacă se iradiază cu o doză de aproximativ 50 r vîrful unui ac de seringă și acul se introduce în piele, injectînd prin ac o soluție de colorant, se constată o dispersie mult mai mare a soluției, în comparație cu folosirea unui ac neiradiat. Această observație sugerează că sub acțiunea iradiației exercitată în vîrful acului, mucopolizaharidele acide din substanța fundamentală a dermului s-au depolimerizat, mărind gradul permeabilității locale [159]. Dacă în lichidul injectat se adaugă o substanță chimioprotectoare, depolimerizarea nu mai apare. Observații similare au fost făcute și asupra peretelui aortei [159]. Tot la nivelul aortei s-a constatat că, după injectare de sulf radioactiv și iradiere cu 500 r, apare la început o slabă stimulare a sintezei mucopolizaharidelor acide

Scanned with OKEN Scanner

sulfatate, urmată de o inhibare progresivă şi degradarea mucopolizaharidelor existente [375, 604].

Dintre toate mucopolizaharidele acide investigate, efectul depolimerizant cel mai net s-a exercitat asupra soluţiilor de acid hialuronic, rezultînd ruperea legăturilor inter- şi intramoleculare, precum şi reducerea lungimii lanţurilor şi a greutăţii moleculare. Ca urmare a desfacerii legăturilor glucozidice ce unesc monomerii constitutivi, apar în soluţie zaharuri cu proprietăţi reducătoare, rapid dializabile [53]. În lichidul sinovial, gradul de polimerizare a acidului hialuronic scade progresiv cu creşterea dozei de iradiaţie, modificările fiind similare cu cele observate în soluţiile pure de acid hialuronic după 500—5 000 r [890]. S-a constatat că efectul depolimerizant al razelor X este mai net pe substanţa umedă, decît pe cea uscată, ceea ce ar sugera că radioliza apei nu mai intervine ca un mecanism intermediar important, aşa cum am menţionat la colagen.

Iradiaţiile prin *raze ultraviolete* sînt urmate de efecte hipostabilizante similare celor produse de razele X [750]. Mecanismul de degradare a acidului hialuronic nu necesită prezenţa de enzime de tip hialuronidazic, ci pare mai curînd legat de procese de oxido-reducere care determină desfacerea legăturilor intermoleculare. În afara acestui mucopolizaharid, şi alte macromolecule ce conţin acid uronic sînt sensibile la degradarea prin oxido-reducere [857]. Efectul depolimerizant al razelor ultraviolete asupra acidului hialuronic prezintă particularitatea de a fi mai rapid în soluţiile ce conţin apă distilată, decît în cele cu variate tipuri de ioni, mai ales de clor. Această observaţie a sugerat ipoteza că radicalii OH, produşi prin radioliza apei, formează cu ionii de clor un produs reactiv intermediar, ce acţionează mai lent asupra legăturilor inter- şi intramoleculare ale acidului hialuronic, decît radicalul OH al apei distilate. În sprijinul acestei ipoteze ar pleda şi faptul că, dacă se adaugă tiosulfat, acesta acţionează competitiv cu substratul şi întîrzie şi mai mult procesul de degradare a mucopolizaharidului [620]. Datele prezentate nu au numai o valoare teoretică, ci şi un interes practic, în primul rînd pentru că, în organism, mucopolizaharidele se găsesc în soluţii cu un mare număr de ioni, putîndu-se astfel explica acţiunea atît de lentă, *in vivo*, a razelor ultraviolete în procesul de depolimerizare a mucopolizaharidelor, comparativ cu observaţiile efectuate *in vitro*; în al doilea rînd, pentru că aceste date deschid perspectiva utilizării de mijloace terapeutice care să blocheze şi mai mult acest proces, păstrîndu-se cît mai intactă organizarea macromoleculară a substanţei fundamentale în cursul iradiaţiilor.

Desigur că în organism mecanismele de acţiune asupra diferitelor macromolecule sînt mult mai complexe şi nu pot fi excluse efecte de potenţare sau de inhibare a activităţii hialuronidazice, efecte de liberare de hidrolaze lizozomiale etc.

Din datele prezentate şi care sînt departe de a epuiza problema modificărilor care apar în organizarea macromoleculară a ţesutului conjunctiv sub acţiunea iradiaţiilor, ne dăm seama cît de adînc şi de multilateral alterează atît razele X, cît şi cele ultraviolete, această organizare, chiar în doze pe care sîntem obişnuiţi să le considerăm „inofensive".

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Abbot J., Holtzer H., J. Cell. Biol., 1966, t. 28, p. 473—487.
2. Abboud M. F., Huston H. J., Clin. Invest., 1961, t. 40, p. 1915—1921.
3. Abdulla Y. H., Adams C. W. M., Morgan R. S., J. Path. Bacteriol., 1967, t. 94, p. 63—71.
4. Abrams E., Sandson J., Ann. Rheum. Diss., 1964, t. 23, p. 295—304.
5. Adam M., Deyl Z., Rosmus J., Coll. Curr. (abstract), 1964, t. 5, p. 166.
6. Adam M., Deyl Z., Rosmus J., Med. Pharm. Exptl., 1966, t. 14, p. 12—16.
7. Adam M., Fietzek P., Kühn K., European J. Biochem., 1968, t. 2, p. 411—414.
8. Adam M., Kühn K., European J. Biochem., 1968, t. 3, p. 407—410.
9. Adams C. W. M., Guy's Hosp. Rep., 1963, t. 112, p. 222—253.
10. Adams C. W. M., *Vascular Histochemistry*, London, Lloyd-Luke, 1967.
11. Ahmad M., Ann. Biochem. Exptl. Med., 1961, t. 21, p. 295—306.
12. Akanson R., Glick D., J. Nat. Cancer Inst., 1948, t. 9, p. 129—143.
13. Albert E. N., Am. J. Anat., 1967, t. 120, p. 611—626.
14. Alfred L. P., Cprvaizer P., Grabar P., Nature (London), 1963, t. 200, p. 698.
15. Almqvist S., Acta Endocrinol., 1960, t. 35, p. 381—398.
16. Alpers J. B., Geriatrics, 1963, t. 18, p. 192—196.
17. Altgelt K., Hodge A. J., Schmitt F. O., Proc. Nat. Acad. Sci., 1961, t. 47, p. 1914.
18. Altschuler C. H., Angevine D. M., Am. J. Path., 1949, t. 25, p. 1061—1076.
19. Altschluer C. H., Angevine D. M. în: *Connective tissue in health and disease*, Munksgaard, Copenhagen, 1954, p. 178—195.
20. Amati A., Castelli B., Giorn. Biochim., 1961, t. 10, p. 292—307.
21. Andersen S. O., Biochim. Biophys. Acta, 1964, t. 93, p. 213.
22. Andersen S. O., Acta Physiol. Scand., 1966, t. 66, suppl. 263.
23. Andersen S. O., Weis-Fogh T., Adv. Insect. Physiol., 1964, t. 2, p. 1—65.
24. Anderson A. J., Biochem. J., 1962, t. 82, p. 372—373.
25. Anderson A. J., Biochem. J., 1962, t. 84, p. 48.
26. Anderson B., Hoffman P., Meyer K., Biochim. Biophys. Acta, 1963, t. 74, p. 309—311.
27. Anderson C. E., Ludowieg J., Harper J. A., Engelman T., J. Bone Joint Surg., 1964, t. 46 A., p. 1176—1183.
28. Anestiadi V. H., Arhiv. Patologhii, 1962, n. 7, p. 26—38.
29. Antonopoulos G. A., Borelius E., Gardell S., Hamnstrom B., Scott J. E., Biochim. Biophys. Acta, 1961, t. 54, p. 213—233.
30. Anwar R. A., Oda G., Nature (London), 1966, t. 210, p. 1254—1255.
31. Apostolakis M., Voigt K. D., J. Atheroscler. Res., 1966, t. 6, p. 102—105.
32. Arvay A., Takács J., Verzar F., Gerontologia, 1963, t. 7, p. 77—84.
33. Arvy L., Sors Ch., Acta Histochem., 1958, t. 6, p. 77—98.
34. Asboe-Hansen G., Fed. Proc., 1966, t. 25, p. 1136—1139.
35. Asboe-Hansen G., Iversen K., 1951, t. 8, p. 90—94.
36. Asboe-Hansen G., Iversen K., Wichmann R., Acta Endocrinol., 1952, t. 11, p. 376.
37. Asher J. S., Nichols G. jr., Fed. Proc., 1965, t. 24, p. 211—218.
38. Aslan A., Vrabiesco A., Gerontologia, 1965, t. 11, p. 34—44.
39. Astorga G., Bollet A. J., Arthr. and Rheum., 1965, t. 8, p. 511—522.
40. Aub J. C., Bauer W., Heath C., Ropes M. J., Clin. Investig., 1929, t. 7, p. 97.

Scanned with OKEN Scanner

197. Castor C. W., J. Lab. Clin. Med., 1962, t. 60, p. 788—798.
198. Castor C. W., Muirden K. D., Lab. Inv., 1964, t. 13, p. 560—574.
199. Castor R. W., Prince R. K., Biochim. Biophys. Acta, 1964, t. 83, p. 165—177.
200. Cathcart E. S., Wollheim F. A., Cohen A. S., J. Immunol., 1967, t. 99, p. 376—385.
201. Cessi C., Bernardi G. în: *Structure and Function of Connective and Skeletal Tissue*, London, Butterworth, 1965, p. 156.
202. Chang H. V., Anat. Rec., 1951, t. 111, p. 23—46.
203. Chapman J. A., Kellgren J. H., Steven S. F., Fed. Proc., 1966, t. 25, p. 1181—1812.
204. Chobanian A. V., Brecher P. I., Lillie R. D., Wotiz H. H., J. Lipid. Res., 1968, t. 9, p. 701—711.
205. Chu Y. C., Liu K. T., Lui H. P., Sheng. Li Hsuch Pao, 1965, t. 28, p. 241—247.
206. Chulkova T. M., Orekhovici V. N., Voprosi Med. Klin., 1965, t. 11, p. 76—77.
207. Chung A. C., Houck J. C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1964, t. 115, p. 631—633.
208. Chvapil M., Physiol. Bohemoslov., 1959, t. 8, p. 186—194.
209. Chavpil M., *Physiology of Connective Tissue*, London, Blackwell, 1967.
210. Chvapil M., Hruza Z., Gerontologia, 1959, t. 3, p. 241—248.
211. Chvapil M., Hurych J., Nature (London), 1959, t. 184, p. 1145.
212. Chavapil M., Cmuchalova B., Nature (London), 1960, t. 186, p. 808—807.
213. Chvapil M., Cmuchalova B., Exptl. Med. Surg., 1961, t. 19, p. 171—182.
214. Chvapil M., Deyl Z., Gerontologia, 1964/65, t. 10, p. 199—234.
215. Chvapil M., Hurych J., Thérapie, 1967, t. 22, p. 1203—1220.
216. Cifonelli J. A., Dorfman A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1961, t. 4, p. 328—332.
217. Clamp J. R., Putnam F. W., C., J. Biol. Chem., 1964, t. 239, p. 3233.
218. Clausen B., Lab. Inv., 1962, t. 11, p. 229—234.
219. Clausen B., Lab. Inv., 1962, t. 11, p. 1340—1345.
220. Clausen B., Lab. Inv., 1963, t. 12, p. 538—542.
221. Clein L. J., Kowalewski K., Canad. J. Surg., 1962, t. 5, p. 108—118.
222. Clerci E., Pernis B., Acta Histochem., 1958, t. 6, p. 174—186.
223. Cmuchalova B., Chvapil M., Pracovni Lekar, 1963, t. 15, p. 30—34.
224. Cmuchalova B., Chvapil M. în: 4th Nat. Coll. Symp., Hluboka, Cehoslovacia, 1964.
225. Cochrane W., Davies D. V., Dorling J., Bywaters E. G. L., Ann. Rheum. Diss., 1964, t. 23, p. 345—356.
226. Cohen A. S., Lab. Inv., 1966, t. 15, p. 64—65.
227. Cohen A. S., Med. Clin. Of. North Am., 1968, t. 52, p. 643—653.
228. Cohen A. S., Cakins E., J. Cell. Biol., 1964, t. 21, p. 481—488.
229. Collins D. H., McElligott T. F., Ann. Rheum. Diss., 1960, t. 19, p. 318—325.
230. Collins D. H., Mea Chim G., Ann. Rheum. Diss., 1961, t. 20, p. 117—122.
231. Comb D. G., Roseman S., J. Biol. Chem., 1960, t. 235, p. 2529—2533.
232. Consden R., Kirrane J. A., Nature (London), 1967, t. 215, p. 165—166.
233. Conway J., Smith K. S., Circulation, 1957, t. 15, p. 827—829.
234. Cooper D. R., Davidson R. J., Biochem. J., 1966, t. 98, p. 655—661.
235. Cortesi C., Fini-Storchi A., Boll. Mal. Orecchio Gola Nasa, 1958, t. 76, p. 217—218.
236. Cossel L., Beitr. Path. Anat. allg. Pathol., 1959, t. 103, p. 158—167.
237. Cox R. C., Little K., Proc. Roy. Soc., 1961, t. 155 b, p. 232—242.
238. Cox R. W., O'Dell B. L., J. Roy. Micr. Sci., 1966, t. 85, p. 401—411.
239. Crane W. A. J., Porter R. E., Ingle O. J., Endocrinology, 1958, t. 63, p. 43—57.
240. Cruikshank B., Hill A. G. S., J. Path. Bacter., 1953, t. 66, p. 283—298.
241. Csaba G., Bierbauer J., Réti J., Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 1967, t. 18, p. 105—111.
242. Csaba G., Olah I., Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 1968, t. 19, p. 347—362.
243. Cullen B. M., Harkness R. D., J. Physiol., 1960, t. 152, p. 419—436.
244. Curran R. C., Crane W. A. J., J. Path. Bacter., 1962, t. 84, p. 405—422.
245. Curri S. B., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1959, t. 34, p. 1762.
246. Curri S. B., Anat. Patol. Oncol., 1959, t. 16, p. 900—906.
247. Curtiss P. H., Klein L., J. Bone Joint Surg., 1963, t. 45 A, p. 797—806.
248. Czerkawski J. W., Nature (London), 1962, t. 194, p. 869.
249. Dahlquist F. M., Raftery M., Nature (London), 1967, t. 213, p. 625.
250. Dalferes E. R., Radhakrisnamurthy B., Berenson G. S., Arch. Biochem. Biophys., 1967, t. 118, p. 284—291.

Scanned with OKEN Scanner

1197. Woods J. F., Nichols G. jr., Nature (London), 1965, t. 208, p. 1325—1326.
1198. Woods J. F., Nichols G. jr., J. Cell Biol., 1965, t. 26, p. 747—757.
1199. Woodward S. C., Hermann J. B., Fed. Proc., 1966, t. 25, p. 537.
1200. Wright I., J. Clin. Path., 1963, t. 16, p. 499—522.
1201. Wu F. C., Laskowski M., J. Biol. Chem., 1960, t. 235, p. 1680.
1202. Wünsch E., Hiedrich H. G., Z. Physiol. Chem., 1963, t. 333, p. 149.
1203. Wynn C. H., Wahid M. A., Biochem. J., 1966, t. 98, p. 10P—11P.
1204. Yamada H., Yasunobu K. T., J. Biol. Chem., 1962, t. 237, p. 1511.
1205. Yater W. M., Birkeland I. W., Am. Heart. J., 1929—30, t. 5, p. 781.
1206. Yoshida E., Noda H., Biochim. Biophys. Acta, 1965, t. 105, p. 562—574.
1207. Yoshikawa T., J. Jap. Biochem. Soc. (Tokyo), 1961, t. 33, p. 264.
1208. Youssef S. A., Geever E. F., Levenson S. M., Surg. Forum., 1966, t. 17, p. 89—90.
1209. Yu S. Y., Circulation, 1964, t. 30, p. 111—132.
1210. Yu S. Y., Gerontologia, 1965, t. 5, p. 15.
1211. Yu S. Y., Blumenthal H. T., J. Gerontol., 1958, t. 13, p. 366.
1212. Yu S. Y. Blumenthal H. T. în: *The Connective Tissue* (ed. B. M. Wagner şi D. E. Smith), Baltimore, Williams and Wilkins, 1967.
1213. Zahcariae F., *Acid Mucopolysaccharides in the Females Genitale System and their Role. in the Mechanism of Ovulation*. Copenhagen, Periodica, 1959.
1214. Zachariae F., Thorsoe H. în: *Hormones and Connective Tissue* (ed. Asboe-Hansen), Copenhagen, Munksgaard, 1966.
1215. Zahir M., Brit. J. Surg., 1964, t. 51, p. 457—461.
1216. Zalokar M., J. Gerontol., 1967, t. 22, p. 18—27.
1217. Zederfeldt B., Pathol. Biol., 1962, t. 10, p. 1543—1546.
1218. Zemplenyi T., J. Atheroscler. Res., 1967, t. 7, p. 725—728.
1219. Ziff M., Gribetz J. J., Schubert M., Contemp. Rheumatol., 1956, t. 4, p. 87.
1220. Ziff M., Gribetz J., Lospalluto J., J. Clin. Inv., 1960, t. 39, p. 405.
1221. Ziffren S. E., Hosie R. T., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1955, t. 90, p. 650.
1222. Zimmermann K. W., Z. mikr. Anat. Frsch., 1929, t. 18, p. 520—552.
1223. Zugibe F. T., J. Histochem. Cytochem., 1962, t. 10, p. 441 — 448.
1224. Zugibe F. T., J. Histochem. Cytochem., 1963, t. 11, p. 35.
1225. Zugibe F. T., Brown K. D., Circulat. Res., 1960, t. 8, p. 287—295.
1226. Zvaifler N. J., Arthr. and Rheum., 1965, t. 8, p. 289.

ACADEMIA BIBLIOTECA

Scanned with OKEN Scanner

Redactor: DR. MIRCEA ANGELESCU
Tehnoredactor: PETRU BRUMĂ

Bun de tipar 21.09.1970. Hîrtie tipar înalt ilustrație, format 16/700×1000, de 80 G/m². Coli de tipar 22. Planşe 20. C.Z. pentru biblioteci mari 611—018.2. C.Z. pentru biblioteci mici 611—018.

Întreprinderea Poligrafică „INFORMAȚIA"
București, str. Brezoianu, nr. 23—25.
Republica Socialistă România

Scanned with OKEN Scanner